

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-535488  
(P2004-535488A)

(43) 公表日 平成16年11月25日(2004.11.25)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

C08F 226/06

F 1

C08F 226/06

テーマコード(参考)

4 J 1 O O

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 50 頁)

(21) 出願番号	特願2002-592364 (P2002-592364)	(71) 出願人	500467390 スリーエム イノベイティブ プロパティズ カンパニー アメリカ合衆国, ミネソタ 55133-3427, セント ポール, ピー. オー. ボックス 33427, スリーエム センター
(86) (22) 出願日	平成14年2月22日 (2002.2.22)	(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(85) 翻訳文提出日	平成15年11月14日 (2003.11.14)	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敏
(86) 國際出願番号	PCT/US2002/005433	(74) 代理人	100087413 弁理士 古賀 哲次
(87) 國際公開番号	W02002/094890	(74) 代理人	100111903 弁理士 永坂 友康
(87) 國際公開日	平成14年11月28日 (2002.11.28)		
(31) 優先権主張番号	09/860,944		
(32) 優先日	平成13年5月18日 (2001.5.18)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】アズラクトン官能性親水性コーティングおよびヒドロゲル

## (57) 【要約】

アズラクトン官能性ヒドロゲルを含む表面コーティング、およびそこに該コーティングが配置された物品が開示される。該コーティングを製造する方法、および該ヒドロゲルのゲル化時間を制御する方法も開示される。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

複数のアズラクトン部分、複数のアズラクトン官能基、および少なくとも1種類のコモノマーを含む、少なくとも1種類のアズラクトン官能性コポリマー、並びに第1の部分と第2の部分とを含む、少なくとも1種類の架橋剤、を含む基材をコーティングするための架橋ヒドロゲルであって、第1の架橋剤の前記第1の部分が第1のアズラクトン部分に共有結合され、前記第1の架橋剤の第2の部分が第2のアズラクトン部分又は第2の架橋剤に共有結合される、架橋ヒドロゲル。

**【請求項 2】**

前記第1の架橋剤の第2の部分が、第2のアズラクトン部分に共有結合される、請求項1に記載の架橋ヒドロゲル。

**【請求項 3】**

少なくとも1種類の架橋剤が一級ポリアミンを含む、請求項2に記載の架橋ヒドロゲル。

**【請求項 4】**

前記一級ポリアミンがエチレンジアミン；1，3-プロパンジアミン；1，3-ジアミノ-2-ヒドロキシプロパン；1，6-ヘキサジアミン；又はトリス-(2-アミノエチル)アミンである、請求項3に記載の架橋ヒドロゲル。

**【請求項 5】**

少なくとも1種類の架橋剤が、ポリエーテルポリアミンを含む、請求項2に記載の架橋ヒドロゲル。

**【請求項 6】**

前記ポリエーテルポリアミンが、4，7，10-トリオキサ-1，13-トリデカンジアミン；3，6-ジオキサ-1，8-ジアミノオクタン；アミンを末端とするポリエチレングリコールホモポリマー；アミンを末端とするポリエチレングリコールコポリマー；アミンを末端とするポリプロピレングリコールホモポリマー；又はアミンを末端とするポリプロピレンコポリマーである、請求項5に記載の架橋ヒドロゲル。

**【請求項 7】**

少なくとも1種類の架橋剤が、1°/2°アミン含有化合物を含む、請求項2に記載の架橋ヒドロゲル。

**【請求項 8】**

前記1°/2°アミン含有化合物が、N-メチル-1，2-エタンジアミン；N-エチル-1，2-エタンジアミン；又はN-イソプロピル-1，2-エタンジアミンである、請求項7に記載の架橋ヒドロゲル。

**【請求項 9】**

前記第1の架橋剤の前記第2の部分が、第2の架橋剤に共有結合される、請求項1に記載の架橋ヒドロゲル。

**【請求項 10】**

前記第1の架橋剤および前記第2の架橋剤が、同じ化学構造式を有する、請求項9に記載の架橋ヒドロゲル。

**【請求項 11】**

前記第1の架橋剤および前記第2の架橋剤が、異なる化学構造式を有する、請求項9に記載の架橋ヒドロゲル。

**【請求項 12】**

少なくとも1種類の架橋剤が、ヘテロ二官能性架橋剤を含む、請求項9に記載の架橋ヒドロゲル。

**【請求項 13】**

前記ヘテロ二官能性架橋剤が、アミノアルキルモノアルコキシラン、アミノアルキルジアルコキシラン、又はアミノアルキルトリアルコキシランである、請求項12に記載の架橋ヒドロゲル。

10

30

40

50

**【請求項 14】**

前記ヘテロ二官能性架橋剤が、3-アミノプロピルトリメトキシシラン、3-アミノプロピルトリエトキシシラン、又はN-[3-(トリメトキシシリル)プロピル]エチレンジアミンである、請求項13に記載の架橋ヒドロゲル。

**【請求項 15】**

少なくとも1種類のコモノマーが、アクリルアミド、メタクリルアミド、N-一置換アクリルアミド、N,N-二置換アクリルアミド、N-一置換メタクリルアミド、N,N-二置換メタクリルアミド、N-ビニルアミド、又はヒドロキシアルキルアクリレートである、請求項1に記載の架橋ヒドロゲル。

**【請求項 16】**

少なくとも1種類のコモノマーが、イオン性コノモマーである、請求項1に記載の架橋ヒドロゲル。

**【請求項 17】**

前記イオン性コモノマーが、アクリル酸、メタクリル酸、マレイン酸、フマル酸、イタコン酸、ビニルリン酸、ビニルホスホン酸、スチレンスルホン酸、2-アクリルアミド-2-メチル-1-プロパンスルホン酸、2-ビニルピリジン、3-ビニルピリジン、4-ビニルピリジン、(3-アクリルアミドプロピル)トリメチルアンモニウムクロリド、2-ジエチルアミノエチルアクリレート、2-ジエチルアミノエチルメタクリレート、3-ジメチルアミノプロピルアクリレート、又は3-ジメチルアミノプロピルメタクリレートである、請求項16に記載の架橋ヒドロゲル。

10

20

**【請求項 18】**

少なくとも1種類のコモノマーが、非親水性である、請求項1に記載の架橋ヒドロゲル。

**【請求項 19】**

前記非親水性コモノマーが、フリーラジカル重合性モノマーを含む、請求項18に記載の架橋ヒドロゲル。

**【請求項 20】**

前記フリーラジカル重合性モノマーがアクリル酸エステル、メタクリル酸エステル、又はスチレンである、請求項19に記載の架橋ヒドロゲル。

**【請求項 21】**

前記コポリマーが、約50質量%未満の非親水性モノマーを含む、請求項18に記載の架橋ヒドロゲル。

30

**【請求項 22】**

前記コポリマーが、約30質量%未満の非親水性モノマーを含む、請求項21に記載の架橋ヒドロゲル。

**【請求項 23】**

基材；および

前記基材上に配置されるヒドロゲルコーティング：

を含む物品であって、前記コーティングが、

i)複数のアズラクトン部分、および複数のアズラクトン官能基を含む、少なくとも1種類のアズラクトン官能性コポリマー、および

40

i i)第1の部分および第2の部分を含む少なくとも1種類の架橋剤、  
を含み、

第1の架橋剤の前記第1の部分が、第1のアズラクトン部分に共有結合され、前記第1の架橋剤の前記第2の部分が、第2のアズラクトン部分又は第2の架橋剤の一方に共有結合される、物品。

**【請求項 24】**

前記基材が、プレート、フィルム、粒子、纖維、カラム、ビーズ、ウェブ、又は膜を含む、請求項23に記載の物品。

**【請求項 25】**

プライマーを更に含む、請求項23に記載の物品。

50

**【請求項 2 6】**

前記プライマーがポリエチレンイミン、ポリビニリデンクロリド、金属酸化物のコロイド分散体、又は両端官能性シランである、請求項 2 5 に記載の物品。

**【請求項 2 7】**

基材、

前記基材上に配置されるヒドロゲルコーティングであって、

i ) 複数のアズラクトン部分、および複数のアズラクトン官能基を含む、少なくとも 1 種類のアズラクトン官能性コポリマーと、

i i ) 第 1 の部分および第 2 の部分を含む少なくとも 1 種類の架橋剤と、

を含むコーティング、および

官能性物質、を含む複合材料であって、

第 1 の架橋剤の前記第 1 の部分が、第 1 のアズラクトン部分に共有結合され、前記第 1 の架橋剤の第 2 の部分が、第 2 のアズラクトン部分又は第 2 の架橋剤に共有結合される複合材料。

**【請求項 2 8】**

前記基材が、プレート、フィルム、粒子、纖維、カラム、ビーズ、ウェブ、又は膜を含む、請求項 2 7 に記載の複合材料。

**【請求項 2 9】**

プライマーを更に含む、請求項 2 3 に記載の複合材料。

**【請求項 3 0】**

前記プライマーがポリエチレンイミン、ポリビニリデンクロリド、金属酸化物のコロイド分散体、又は両端官能性シランである、請求項 2 9 に記載の複合材料。

**【請求項 3 1】**

前記官能性物質が、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、多糖類、又はこれらの任意の組合せである、請求項 2 7 に記載の複合材料。

**【請求項 3 2】**

架橋ヒドロゲルコーティングを製造する方法であって、

複数のアズラクトン官能基を含む、少なくとも 1 種類のアズラクトン官能性コポリマーを調製する段階、

前記アズラクトン官能性コポリマーを有機溶媒中で希釈する段階、

第 1 の官能基および第 2 の官能基を含む少なくとも 1 種類の架橋剤を前記アズラクトン官能性コポリマーに添加する段階、および

第 1 の架橋剤の前記第 1 の官能基を第 1 のアズラクトン官能基に共有結合させ、前記第 1 の架橋剤の第 2 の官能基を第 2 のアズラクトン官能基、又は第 2 の架橋剤に共有結合させることにより前記ヒドロゲルを重合させ、ヒドロゲルを形成する段階、

を含む、方法。

**【請求項 3 3】**

ヒドロゲルのゲル化時間を制御する方法であって、

複数のアズラクトン官能基を含むアズラクトン官能性コポリマーの溶液を提供する段階、

第 1 の官能基および第 2 の官能基を含む少なくとも 1 種類の架橋剤を選択する段階、

前記選択された少なくとも 1 種類の架橋剤を前記溶液に添加する段階、

第 1 の架橋剤の前記第 1 の官能基を第 1 のアズラクトン官能基と共有結合させる反応条件を提供する段階、および

第 1 の架橋剤の前記第 2 の官能基を第 2 のアズラクトン官能基又は第 2 の架橋剤と共に結合させるように前記反応条件を変更し、ヒドロゲルを形成する段階、

を含む、方法。

**【請求項 3 4】**

前記第 1 の架橋剤の第 2 の官能基が、第 2 のアズラクトン官能基に共有結合する、請求項 3 3 に記載の方法。

**【請求項 3 5】**

10

20

30

40

50

少なくとも1種類の架橋剤が、1°/2°アミン含有化合物を含む、請求項34に記載の方法。

【請求項36】

前記1°/2°アミン含有化合物が、N-メチル-1,2-エタンジアミン；N-エチル-1,2-エタンジアミン；又はN-イソプロピル-1,2-エタンジアミンである、請求項35に記載の方法。

【請求項37】

前記第1の架橋剤の第2の官能基が、第2の架橋剤に共有結合する、請求項33に記載の方法。

【請求項38】

前記第1の架橋剤および前記第2の架橋剤が同じ化学構造式を有する、請求項37に記載の方法。

【請求項39】

前記第1の架橋剤および前記第2の架橋剤が、異なる化学構造式を有する、請求項37に記載の方法。

【請求項40】

少なくとも1種類の架橋剤が、ヘテロ二官能性架橋剤を含む、請求項37に記載の方法。

【請求項41】

前記ヘテロ二官能性架橋剤が、アミノアルキルモノアルコキシラン、アミノアルキルジアルコキシラン、又はアミノアルキルトリアルコキシランである、請求項40に記載の方法。

【請求項42】

前記ヘテロ二官能性架橋剤が、3-アミノプロピルトリメトキシラン、3-アミノプロピルトリエトキシラン、又はN-[3-(トリメトキシリル)プロピル]エチレンジアミンである、請求項41に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生物活性分子の固定化に有用な多孔質ヒドロゲルコーティングに関し、特に、DNAおよびたんぱく質アレイの調製、診断用デバイス、および生物種の分離用物質に有用な、架橋アズラクトン官能性ヒドロゲルコーティングに関する。更に詳細には、本発明は、多孔質で親水性の架橋アズラクトン官能性コーティングおよびゲルに関する。

【背景技術】

【0002】

重合性アズラクトンとオレフィン性不飽和モノマーとのコポリマーに由来するコーティングは既知である。このようなコーティングは、一般に、硬質でガラス転移温度( $T_g$ )の高い、疎水性コポリマーに由来する。架橋は、アズラクトンコポリマーを、一般にアズラクトンに対してほぼ化学量論的な量の架橋剤と一緒に、揮発性有機液体中に分散又は溶解させ、この混合物を基材に塗布した後、コーティングをアズラクトン開環反応を経て架橋剤で架橋することにより達成される。適した架橋剤は、ポリオールおよびポリアミンである。エチレンジアミンなどのポリアミンは、室温でアズラクトンと反応することにより架橋を形成する。アズラクトンと一級アミンとの間の反応が迅速であるため、コーティング混合物中にケトン溶媒を混入させることが望ましい。ポリオールは、アズラクトンとかなり緩速に反応し、架橋を促進するために、一般に、強酸性又は塩基性の触媒などの触媒を必要とする。

【0003】

アズラクトンコポリマーに由来する様々なコーティングが既知である。例えば、既知のコーティングには、アクリル酸エステルを有する2-アルケニルアズラクトンと、少なくとも1つのヒドロキシル基を有する共重合性ビニリデン化合物とのコポリマーなどが挙げられ、これは乾燥又は穏やかな加熱で架橋する。このようなポリマーは、ポリマーの一つの

10

20

30

40

50

鎖のヒドロキシル基と、他の鎖のアズラクトン基との反応により架橋する。一般に、架橋反応を促進するために、ここでも、酸性又は塩基性の触媒などの触媒が必要である。放射線に暴露することにより架橋できるアズラクトンコポリマーに由来するコーティングは、画像形成用途に有用である。未架橋アズラクトンコポリマーを使用して様々な基材をコーティングしてもよい。これらのコーティング済みの基材を、タンパク質などの生物活性種を含む官能性物質の固定化に使用することができる。架橋されたアズラクトン官能性部分は、化学的に反応性がある多孔質の担体の表面を覆うコーティングに含まれてもよい。これらの反応性担体は、生物活性物質と反応し、付加物担体を製造することができる。

#### 【発明の開示】

##### 【発明が解決しようとする課題】

10

##### 【0004】

アズラクトン官能性物質に由来するコーティングの製造には様々な方法があり、それらのうち幾つかは、他の種の固定化に有用なアズラクトン官能性コーティングを提供するが、生物活性物質の固定化に使用するコーティング済みの材料を提供する、追加の、又は改善された方法がまだ必要とされている。

##### 【課題を解決するための手段】

##### 【0005】

本発明は、官能性物質を基材に共有結合で付着させることを目的とする、様々な基材に塗布できる反応性親水性コーティングおよびヒドロゲルの調製に関する。特に、本発明は、複数のアズラクトン部分、複数のアズラクトン官能基、および少なくとも1種類のコモノマーを含む少なくとも1種類のアズラクトン官能性コポリマーと、第1の部分および第2の部分を含む少なくとも1種類の架橋剤とを含む、基材をコーティングするための架橋ヒドロゲルを提供し、第1の架橋剤の第1の部分は、第1のアズラクトン部分に共有結合され、第1の架橋剤の第2の部分は第2のアズラクトン部分又は第2の架橋剤に共有結合される。

20

##### 【0006】

本発明の架橋ヒドロゲルの幾つかの実施形態では、第1の架橋剤の第2の部分は、第2のアズラクトン部分に共有結合される。このような実施形態では、第1の架橋剤は、一級ポリアミン、ポリエーテルポリアミン、一級および二級アミンを共に含有する化合物、又は他の任意の好適な架橋剤であってよい。他の実施形態では、第1の架橋剤の第2の部分は、第2の架橋剤分子に共有結合される。このような実施形態では、第1の架橋剤は、第1の架橋剤と同じ化学構造式を有する第2の架橋剤分子に結合されてもよい。或いはまた、第1の架橋剤は、第1の架橋剤とは異なる化学構造式を有する第2の架橋剤に結合されてもよい。前述の実施形態のどちらでも、第1の架橋剤、第2の架橋剤、又は両方がアミノアルキルアルコキシランなどのヘテロ二官能性(heterobifunctional)架橋剤であってよい。

30

##### 【0007】

本発明の幾つかの実施形態では、架橋ヒドロゲルには、イオン性又は非親水性コモノマーから製造されるポリマーが含まれる。

40

##### 【発明を実施するための最良の形態】

##### 【0008】

本発明は、官能性物質を基材に共有結合で付着させることを目的とする、様々な基材の表面、又は様々な構造の(即ち、マクロ、又はマイクロ構造の)基材の構造体内に配置することができる反応性親水性コーティングおよびヒドロゲルの調製に関する。より詳細には、本発明は、組成物、およびアズラクトン官能基を含むコーティングを基材表面に塗布する方法を提供する。コーティングには、薄いフィルム、厚いゲル、又は任意の中間の厚さのものが挙げられてもよい。これらのコーティングは、官能性物質を基材に付着させるために提供されてもよい。「官能性物質」は、(a)アズラクトンと反応できる求核基、および(b)別の反応部位を有する任意の化学種であり、特定の目的を達成するため基材に付着されることが望ましい。本発明のある実施形態では、官能性物質は、生物活性物質を

50

含む。

【0009】

本発明の目的では、次の定義は、記載される意味を有するものとする。

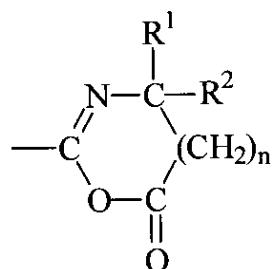
【0010】

本明細書で使用される場合、「1° / 2° アミン含有化合物」は、1つの一級アミン含有官能基、および少なくとも1つの二級アミン含有官能基を有する、任意の化合物、分子、組成物、又は複合体を意味する。

【0011】

「アズラクトン官能基」は、次の構造式

【化1】



10

20

(式中、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、独立して、炭素数1～14のアルキル基、炭素数3～14のシクロアルキル基、環原子が5～12個のアリール基、炭素数6～26で、S、N、又は非過酸化物O原子を0～3個有するアレニル基であるか、又はR<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、それらが両方とも結合している炭素と一緒にになって、炭素数4～12の炭素環の環を形成し、nは0又は1の整数である。)を有する官能基を意味する。

【0012】

本明細書で使用される場合、「官能基」は、単一の化学的構成要素として機能する傾向がある、分子、化合物、組成物又は複合体中の原子の組合せを意味する。官能基の例は、以下に限定されないが、-NH<sub>2</sub>（アミン）、-COOH（カルボキシル）、シロキサン、-OH（ヒドロキシル）、およびアズラクトンなどが挙げられる。例えば、反応前に、ある架橋剤は1つ以上のアミン官能基を含有してもよく、あるコポリマーは、1つ以上のアズラクトン官能基を含有してもよい。

【0013】

本明細書で使用される場合、「ヘテロ二官能性」は、任意の分子、化合物、組成物又は複合体に関して、互いに異なる2つ以上の官能基、少なくとも2つの官能基を有することを意味するものとする。例えば、アミノ酸は、互いに異なる2つの官能基、アミノ基およびカルボキシル基を含有するため、ヘテロ二官能性である。

【0014】

「ヒドロゲル」は、水を含有するゲル、即ち、親水性であり、水を吸収するが水に不溶性であるポリマーを意味する。

【0015】

モノマーに関する「イオン性」は、形式電荷を本質的に有するモノマー、並びに水性媒体と接触した時に形式電荷を得ることができるほど十分に酸性又は塩基性であるモノマーのことを指すと広く考えられるものとする。

【0016】

本明細書で使用される場合、「部分」は、第2の反応物の官能基と組合わざり、反応生成物中の共有結合を形成する、第1の反応物からの官能基の一部を意味するものとする。例えば、ペプチド結合では、ペプチド結合に参加する-NH-は、1つのアミノ酸のアミン官能基から残存し、従って、本明細書では、ペプチド生成物中のアミン部分であると考え

30

40

50

られる。ペプチド結合に参加する - C = O は、第 2 のアミノ酸のカルボン酸官能基から残存し、従って、ペプチド生成物中のカルボキシル部分と考えられる。

#### 【 0 0 1 7 】

本明細書で使用される場合、「非親水性」は、任意の分子、化合物、組成物又は複合体に関する、親水性指数が約 40 未満の任意の物質のことを言うものとする。

#### 【 0 0 1 8 】

「ポット寿命」は、コーティング配合物が、溶解性で均一であり、低い付隨粘度 (adhesive viscosity) を有する状態を維持する時間の長さを意味する。

#### 【 0 0 1 9 】

「プライマー」は、コポリマーと基材との間の接着を促進する又は改善する、任意の好適な物質を意味するものとする。「プライマー」は、不活性プライマーおよび反応性プライマーの両方を含むものとする。不活性プライマーは、コポリマーと基材との間の接着を促進する中間層の役割をする。反応性プライマーは、コポリマーと基材との間に共有結合を形成し、接着を改善する。

#### 【 0 0 2 0 】

本発明のアズラクトン官能性ヒドロゲルコーティングは、最初に親水性アズラクトン官能性コポリマーの溶液を調製することにより製造される。次いで、このコポリマーは、適切な架橋剤と配合された後、混合物は適切な基材にコーティングされるか、又は塗布される。架橋剤は、コポリマーのアズラクトン基の一部と反応することにより、多孔質の架橋ヒドロゲルを形成する。これで、ヒドロゲルコーティング中の未反応のアズラクトン基は、適切な最終用途のため、官能性物質の付着に利用可能である。

#### 【 0 0 2 1 】

アズラクトン官能性コポリマーは、アルケニルアズラクトンモノマーをコモノマーと共に重合させる様々なフリー・ラジカル重合法で調製されてもよい。典型的な溶液重合法は、例えば、ハイルマン (H e i l m a n n) らに発行された米国特許第 4,304,705 号明細書、およびコリンスキー (K o l l i n s k y) らに発行された米国特許第 3,583,950 号明細書に報告されている。本発明の目的に、好適なコモノマーには、限定的ではないが、アクリルアミド、メタクリルアミド、N-一置換、N,N-二置換アクリルアミドおよびメタクリルアミド、N-ビニルホルムアミドおよびN-ビニルピロリドンなどのN-ビニルアミド、および、2-ヒドロキシエチルメタクリレートおよびN-アクリロイル-トリスヒドロキシメチルアミノメタンなどのヒドロキシアルキルアクリレートおよびアクリルアミドなどの親水性、又は水溶性モノマーなどが挙げられる。多くの用途では、コーティングに生物高分子が非特異的に結合する可能性を減少させるために、電荷を帯びていないコポリマーが望ましい可能性がある。しかし、特定の用途では、イオン性コモノマーも、コポリマーに組み込まれてよい。イオン性モノマーは、陰イオン性であっても又は陽イオン性であってもよい。陰イオン性モノマーには、不飽和酸およびその金属塩、例えば、アクリル酸、メタクリル酸、マレイン酸、フマル酸、およびイタコン酸、ビニルリン酸およびビニルホスホン酸、スチレンスルホン酸、並びに 2-アクリルアミド-2-メチル-1-プロパンスルホン酸などが挙げられ；陽イオン性モノマーには、アミン含有モノマー、例えば、2-、3-又は 4-ビニルピリジン、(3-アクリルアミドプロピル)トリメチルアンモニウムクロリド、2-ジエチルアミノエチルアクリレートおよびメタクリレート、3-ジメチルアミノプロピルアクリレートおよびメタクリレート、並びに同様に置換されたアクリルアミドおよびメタクリルアミドなどが挙げられる。

#### 【 0 0 2 2 】

本発明の範囲内のコポリマーには、また、非親水性コモノマーが含まれてもよい。本明細書で使用される場合、非親水性コモノマーには、親水性指数が約 40 未満の任意のコモノマーが含まれる。親水性指数（又は「H.I.」）は、本発明で使用するのに好適なモノマーの親水性特性を説明するのに有用な可能性がある、経験的な概念である。H.I. は、次

**H.I.= モノマー中の全親水基の総分子量 × 100****モノマーの分子量**

のように定義される。親水基は、一般に、水と水素結合を形成できる官能基である。親水基の例には、以下に限定されないが、-N-、-NH-、-NH<sub>2</sub>-、-O-、-OH、-COOH、-C=O、-OC=O、-CO<sub>2</sub><sup>-</sup>M<sup>+</sup>（式中、M<sup>+</sup>は、アルカリ又はアルカリ土類金属陽イオンである）、-SH、SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>M<sup>+</sup>、-NHCONH-、および他のイオン性官能基などが挙げられる。

**【0023】**

非親水性コモノマーは、約50質量%未満で組み込まれてもよく、コーティングの十分な親水性をまだ維持し、非特異的な結合を最小限にすることを助ける。ある実施形態は、約30質量%未満で非親水性コモノマーを組み込む。好適な非親水性コモノマーには、限定的ではないが、既知のアクリル酸エステルおよびメタクリル酸エステル、スチレン、および他のフリーラジカル重合性モノマーなどが挙げられる。

**【0024】**

適切なアズラクトン官能性コポリマーが調製されると、架橋剤をそのコポリマーに添加することにより、コーティング混合物が配合される。これは、アズラクトン官能基と非反応性の適切な有機溶媒中で簡便に行われる。コポリマーは、架橋剤を添加する前に、溶媒で約5質量%以下の濃度に希釈されてもよい。他の実施形態では、コポリマーは、架橋剤を添加する前に、溶媒で約10質量%、又は約20質量%の濃度に希釈されてもよい。希釈に使用される溶媒は、コポリマーが調製されるのと同じ溶媒であっても、又は1種類以上の異なる溶媒であってもよい。架橋時間、又はゲル化時間は、コポリマーの濃度、および添加する架橋剤の量で簡便に制御することにより、構造体をコーティングするのに、又は充填するのに十分な時間、続いて完成製品を提供するのに迅速な硬化時間が可能になる。一般に、コポリマーの濃度が低いほど、又は架橋剤の量が少ないほど、架橋/ゲル化の起こる時間が長くなる。

**【0025】**

本発明の目的に有用な架橋剤には、限定的ではないが、アズラクトン官能基と開環反応する求核基を含む物質などが挙げられる。好適な架橋剤には、一級ポリアミン、例えば、エチレンジアミン、1,3-プロパンジアミン、1,3-ジアミノ-2-ヒドロキシプロパン、1,6-ヘキサジアミン、およびトリス-(2-アミノエチル)アミン；並びに、ポリエーテルポリアミン、例えば、4,7,10-トリオキサ-1,13-トリデカンジアミン、3,6-ジオキサ-1,8-ジアミノオクタン、並びにアミンを末端とするポリエチレングリコールおよびポリプロピレングリコールのホモポリマーおよびコポリマーなどが挙げられる。本発明の目的を達成するため、架橋剤の求核基と、コポリマーのアズラクトン官能基との間の化学量論は、最終の架橋ヒドロゲルが、まだ反応性アズラクトン官能基を含有するように、1:1未満とすべきである。従って、最初のコポリマー中のアズラクトン含有量は、コーティング配合物に添加されてもよい架橋剤の量に上限を提供する。意図するヒドロゲルの最終用途が、ある程度、配合物中に使用される架橋剤の量を規定してもよい。架橋の量は、ヒドロゲルの膨潤および空隙率に影響を与え、従って、試薬又は目的の分子がヒドロゲル中に、およびヒドロゲルの外に拡散する速度に影響を与える。一般に、架橋が少い方が、ヒドロゲルの有する孔は大きくなり、そのためヒドロゲル中に、より大きい生物高分子が拡散することが可能になる。

**【0026】**

前述のように、コポリマーと架橋剤の濃度を制御することにより、ゲル化時間がある程度

10

20

30

40

50

、制御することができる。本明細書で使用される場合、ゲル化時間は、ゲルを形成できる溶液が、もはや流体でなくなるのに必要な時間のことを言う。多くの場合、これらのパラメータは、ゲル化が起こる前に、適切な形状にコーティング溶液を配置することを可能にする十分な制御を提供する。しかし、幾つかの用途、又は製品概念では、これらのパラメータはそれ自体で、製造に使用するのに十分長いゲル化時間を可能にするわけではない。幾つかの新規な架橋体系の使用により、本発明は、現在、ポット寿命の延びたコーティング配合物を提供する。即ち、コーティング配合物は、長期間、低い付隨粘度 (adherent viscosity) を有する溶解性で均一な状態を維持する。溶媒が蒸発すると、および/又はコーティング済みの基材の温度が上昇すると、コーティング配合物は架橋し、本発明のヒドロゲルを生成する。これらの新規な架橋体系は、ヘテロ二官能性架橋剤、即ち、溶液（例えば、一級アミン）中で周辺温度でアズラクトン基と反応する1つの求核官能基、および溶媒を除去するか又は温度が上昇すると、架橋反応へ導くことができる少なくとも1つの他の官能基を有する、架橋剤を使用することにより達成される。このような方法で使用されてもよい架橋剤の種類の1つは、アミノアルキルアルコキシランであり、例えば、3-アミノプロピルトリメトキシシラン、3-アミノプロピルトリエトキシシラン、N-[3-(トリメトキシシリル)プロピル]エチレンジアミン、又は他のアミノアルキルモノ-、ジ-、およびトリ-アルコキシランである。アミノ基は、アズラクトン基と開環付加反応をし、コポリマーのペンドントのアルコキシラン基を提供する。完全に乾燥した時に、アルコキシ基は、加水分解されており、続いてポリマー鎖の間にシロキサン架橋を形成してもよい。基材の性質に応じて、共有結合は、基材表面上の官能基で同時に作られてもよい（例えば、基材がシリカ質である場合、基材にシロキサン結合が形成されてもよい）。 10

### 【0027】

ポット寿命又はゲル化時間を長くするのに有用な架橋剤の別の種類には、一級/二級(1°/2°)アミン含有化合物などが挙げられる。これらの物質では、一級アミンは、室温でコポリマーのアズラクトン基と迅速に反応するが、二級アミンは比較的緩速に反応する。溶媒を除去すること、コーティング済みの物品の温度を上昇させること、又はこの両方により、二級アミンは反応してヒドロゲルを形成することができる。好適な1°/2°アミン含有化合物には、限定的ではないが、N-メチル-1,2-エタンジアミン、N-エチル-1,2-エタンジアミン、N-イソプロピル-1,2-エタンジアミン、および他のN-アルキルジアミノアルカンなどが挙げられる。N-アルキル置換基の立体的な嵩高さが増大すると、二級アミノ基の反応に対する障害が大きくなり、従って、架橋を形成するため更に高温が必要になる。 20

### 【0028】

配合されると、コーティング溶液を所望の基材に塗布し、乾燥させて（任意選択的に、熱を用いて）本発明のヒドロゲルを製造することができる。コーティング方法は、特定の基材に応じて広範に変化することができ、当該技術分野で既知の方法から選択されてもよい。これらには、例えば、押し出しコーティング、ダイコーティング、浸漬コーティング、エアナイフコーティング、グラビアコーティング、カーテンコーティング、スプレーコーティング、および、ワイヤを巻付けたコーティングロッドの使用などが挙げられる。 30

### 【0029】

ある基材で、親水性アズラクトン官能性ポリマーは、かなり良好な接着を示す。架橋してヒドロゲルを形成すると、コーティングが固定化され、後の操作中に基材からコーティングが取れる可能性が減少する。基材へのコーティングの接着は、必要に応じて、任意の既知の方法で改善されてもよい。このような方法には、限定的ではないが、コロナ、若しくはプラズマ処理などの、基材表面の様々な前処理若しくはコーティング、又はプライマーの塗布などが挙げられる。好適なプライマーには、限定的ではないが、ポリエチレンイミン、ポリビニリデンクロリド、グローブス(Groves)に発行された米国特許第5,602,202号明細書に報告されるものなどのプライマー、バン・オージ(Van Ooij)らに発行された米国特許第5,204,219号明細書、ストフコ(Stofk) 40

o ) らに発行された米国特許第 5 , 4 6 4 , 9 0 0 号明細書、およびビルカディ ( B i l k a d i ) に発行された米国特許第 5 , 6 3 9 , 5 4 6 号明細書に報告されるものなどの両端官能性 ( a m b i f u n c t i o n a l ) シランと組み合わせた無機金属酸化物のコロイド分散体などが挙げられる。ポリオレフィン基材への接着を増大させる他の方法は、バーゴイン ( B u r g o y n e ) らに発行された米国特許第 5 , 5 0 0 , 2 5 1 号明細書に報告されている。

#### 【 0 0 3 0 】

本発明の親水性コーティングおよびヒドロゲルを広範多種の基材に塗布してもよい。基材は、天然又は合成、有機又は無機、多孔質又は無孔質、平坦で実質的に特色がないか、又は高度に構造化されているものであってよい。基材は、フィルム状、粒子状、又は成型されたプラスチック物品であってもよい。好適な基材には、限定的ではないが、ろ過プレートなどの標準的な 9 6 ウェル、 3 8 4 ウェル、又は 1 5 3 6 ウェルのプラスチックマイクロタイターブレート；溝付きマイクロ複製フィルム；マイクロ流動デバイス中のマイクロ流動チャネル、エンボス加工又はマイクロ構造フィルム；管又はキャピラリー；スピンドルチューブ又はスピンドルカラム；ガラス、セラミック、又は金属の粒子若しくは纖維、例えば、多孔質の粒子若しくは纖維；クロマトグラフィー用粒子などの多孔質又は無孔質のポリマー纖維又は粒子；配向、又は無配向のポリマーフィルム；織物ウェブ又は不織ウェブ（織維ウェブなど）；および、多孔質又は微孔質の膜などが挙げられる。

#### 【 0 0 3 1 】

選択される基剤は、意図される用途又はデバイスに依存する。これらのアプリケーションには、限定的ではないが、 D N A 又はタンパク質アレイなどのデバイス；生物分析又は診断用デバイス；キャピラリー電気泳動、電気クロマトグラフィー、又は他の分離デバイス；アフィニティ用クロマトグラフィー担体、イオン交換、疎水性相互作用、又は他の種類の分離および精製；および、細胞の選択又は分離デバイスなどが挙げられる。例えば、基材として配向ポリマーフィルムを使用する場合、国際公開第 W O 9 9 / 5 3 3 1 9 号明細書に記載される高密度の小型化アレイを作成するのに、本発明のコーティングを使用することが有利である。

#### 【 0 0 3 2 】

反応性コーティング又はヒドロゲルが基材に塗布されると、残留アズラクトン官能基は、官能性物質との反応に利用可能である。ここでも、意図される用途は、官能性物質の固有特性を規定する。好ましい官能性物質は、たんぱく質、酵素、オリゴヌクレオチド、又は生物種と相互作用する可能性のある他の任意の種などの生物活性物質である。誘導は、アズラクトン官能性基材の反応に周知のような、緩衝された水性媒体中で実施されてもよいが、有機溶媒などの他の媒体を使用してもよい。

#### 【 実施例 】

#### 【 0 0 3 3 】

以下の実施例は、本発明の特徴、利点、および他の詳細を更に説明するためだけに選択された。しかし、これらの実施例は、この目的に役立つが、特定の成分、および使用される量、並びに他の条件および詳細は、本発明の範囲を不当に制限するものと考えられるべきではないことを明確に理解すべきである。

#### 【 0 0 3 4 】

##### 実施例 1

###### マイクロタイタートレイフォーマット中のゲル形成

9 0 : 1 0 w / w および 7 0 : 3 0 w / w のジメタクリルアミド ( D M A ) とビニルジメチルアズラクトン ( V D M ) とのコポリマーの、メチルエチルケトン ( M E K ) 中で固体分 4 0 % の溶液を、標準的なフリーラジカル重合技術で調製した。それぞれの一部を 2 0 : 1 v / v のイソプロパノール : M E K で希釈し、各コポリマーの固体分 2 . 5 % および 1 0 % の溶液が得られた。次いで、これらの希釈溶液のそれぞれの一部を、反応して 2 . 5 重量 % 、および 1 0 重量 % の架橋密度を提供するのに十分なアミノプロピルトリメトキシシランと配合し、合計 8 種類の異なる配合物が得られた。次いで、これらの溶液を、マ

10

20

30

40

50

イクロピペットを使用して 384 ウェルのポリプロピレン製マイクロタイタートレイのウェルに入れた。ウェルの幾つかは、周辺大気に暴露されたままであったが、他は、スコッチ・ブランド・マジック・補修テープ (Scotch Brand Magic Mending Tape) (ミネソタ州セントポール、ミネソタ・マイニング・アンド・マニュファクチャリング社 (Minnesota Mining and Manufacturing Co., St. Paul, MN)) で被覆された。ウェル中の混合物は、濃厚になり、ゲル化(架橋)するのが観察された。テープを張っていないウェルでは、溶媒の損失により収縮が観察されたが、溶媒又は水を添加すると膨潤が再び起きた。テープを張ったウェルからテープを除去すると、ゲルはウェルからスムーズに引張り出され、隆起したゲルパターンで、テープにしっかりと接着した状態を維持した。90 : 10 のポリ (DMA / VDM) / 10 % 架橋剤から調製されたゲル以外は全て、生物官能性物質、又は他の官能性物質の共有結合による付着に使用できる、残留アズラクトン官能基を有する。

10

20

30

40

50

## 【0035】

## 実施例 2

## 96 ウェルプレート内でのゲルの形成

実施例 1 の配合物を使用して、市販のポリスチレン製 96 ウェルマイクロ滴定プレート中のウェル(各 250 マイクロリットル)を充填した。容積がより大きいため、より長いゲル化時間が観察された。ゲルの幾つかは、実施例 1 に記載されるように、テープでウェルから引き出すことができた。あるいはまた、より少量の溶液、又は固体分 % がより低い溶液を添加することにより、マイクロウェルの内部表面にアズラクトン官能性ヒドロゲルの薄いコーティングを形成することが可能になった。

20

## 【0036】

## 実施例 3

## 1536 ウェルプレートのウェル内での反応性コーティングの形成

80 : 20 w / w ポリ (DMA / VDM) の固体分 40 % の溶液 (MEK) をイソプロパノール (IPA) で固体分 20 % に希釈し、約 10 質量 % の架橋密度を提供するのに十分なエチレンジアミンと配合した後、市販の 1536 ウェルプレートに塗布した。ウインドシールドワイパーブレードを使用して、溶液をコーティングし、ウェルの中に押し込んだ。乾燥すると、反応性アズラクトン官能性ポリマー コーティングがウェル内で得られた。

30

## 【0037】

## 実施例 4

## マイクロタイタートレイ内の薄い反応性コーティングの形成

ポリプロピレン製 384 ウェルマイクロタイタートレイの一部をメタノールおよびイソプロパノールですすいで洗浄した後、50 のオープンで 5 分間乾燥させた。0.1% w / w のポリエチレンイミンの脱イオン水溶液を、1 μl、2 μl、3 μl、4 μl、5 μl、又は 10 μl、分離した 2 列のそれぞれの隣接するウェルに添加した。3 列目のウェルは未処理のままであった。トレーを再び、5 分間、オープン中で乾燥させた。70 : 30 のポリ (DMA / VDM) コポリマーの、固体分 5 % の溶液、2 マイクロリットルを実施例 1 のように調製し、各ウェルに添加した。トレーを再び 5 分間、オープンで乾燥させた。50 mM の 3 - [ (1, 1 -ジメチル -2 -ヒドロキシエチル) アミノ] - 2 - ヒドロキシプロパンスルホン酸 (AMPSO) の脱イオン水溶液 (pH 9) 中で 1 M の硫酸ナトリウムからなる緩衝液を使用して、5 - ( (5 - アミノペンチル) チオウレイジル (thioureidyl) ) フルオレセインカダベリン (1 mg / ml のジメチルホルムアミド溶液、オレゴン州ユージーン、モレキュラー・プローブズ社 (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR)) を 20 マイクログラム / ml の濃度に希釈した。この希釈染料溶液 2 マイクロリットルをコーティング済みのウェルのそれぞれに添加し、乾燥させた。次いで、このトレーを脱イオン水で完全に洗浄し、前記 AMPSO 緩衝液の少量で濡らし、短波長 (254 nm) の UV を照射して観察した。全ウェルの蛍光を検査した。ウェル内の緑色蛍光は、フルオレセインカダベリンがアズラクトンコポリ

マーコーティングと反応し、ウェル内で共有結合したことを示した。次いで、トレーをAMP SO緩衝液で洗浄し、再検査した。未処理のウェル内では、蛍光は観察されなかつたが、これはコーティングがコポリマーに接着せず、AMP SO緩衝液で洗い流されたことを示す。しかし、ポリエチレンイミンでプライマー処理したウェルは全て、まだ、蛍光を示し、PEI濃度の増加に伴い強度も増大した。後で、トレーを1%w/wのSDS(ドデシル硫酸ナトリウム)の脱イオン水溶液で洗浄し、再検査した。変化は見られなかつたが、これは、良好な接着および/又はPEIプライマー処理によって架橋が達成されたことを示した。

#### 【0038】

更に大きいウェル(約8mm×8mmの正方形)があるマイクロタイタートレー、および  
10  
更に多量の様々な溶液を使用して前記の実験を繰り返した。同様の結果が観察された。

#### 【0039】

##### 実施例5

##### 溶媒、濃度、および架橋剤のゲル化時間に対する影響

MEK中で固体分40%に調製した、実施例1(ポリマーA)からの70:30w/wの  
p(DMA/VDM)コポリマーはゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)で重量平均分子量( $M_w$ )が600,000であると決定された。類似のコポリマー(ポリマーB)は  
トルエン中で固体分40%に調製され、 $M_w$ が702,000であると決定された。これらの2種類のコポリマー溶液をメチルエチルケトン(MEK)又はイソプロパノール(IPA)  
20  
のいずれかで固体分5~15%の範囲の濃度に希釈した後、コポリマー中の全モノマー単位の1~10質量%と反応するのに十分なエチレンジアミンと配合した。ゲル化時間(溶液がもはや流体ではない時間)が観察された。結果を表1に列挙する。

#### 【0040】

#### 【表1】

表1. ヒドロゲル形成

ポリマー	固体%	希釈剤	%ED	ゲル化時間
A	10	IPA	1	84分
A	10	IPA	2.5	50分
A	10	IPA	5	27分
A	10	IPA	10	25分
A	15	IPA	1	30分
A	15	IPA	2.5	18分
A	15	IPA	5	16分
A	15	IPA	10	13分
B	5	IPA	10	30分
B	10	IPA	10	2.25分
B	5	MEK	10	>48時間
B	10	MEK	10	60分

30

40

#### 【0041】

これらの結果は、ゲル化時間の制御を表し、また、架橋ヒドロゲルの形成に対するMEKの抑制効果も実証している。

#### 【0042】

コポリマーBをIPAで希釈し、それぞれポリマー濃度50mg/mlおよび100mg/mlの溶液が得られた。各溶液のサンプル(各3ml)を、10%および20%架橋を  
50  
提供するのに十分なジアミンと配合した。利用したジアミンは、N-エチル-1,2-エ

タンジアミン、N - プロピル - 1 , 2 - エタンジアミン、およびN - イソプロピル - 1 , 2 - エタンジアミン（それぞれ、N - E E D 、N - P E D 、およびN - I E D ）であった。ゲル化時間を室温および65度で観察した。室温では、数日にわたってゲル化は観察されなかった。65度では、ゲル化時間は次の順に起こった：N - E E D （最も速い）> N - P E D > N - I E D 。別の実験では、コポリマーB / 10% N - E E D のI P A 溶液を室温で完全に乾燥させた；乾燥したポリマーは、溶媒を添加すると容易に再溶解した。対照的に、65度で乾燥させたサンプルは再溶解せず、架橋は高温で起こったことを示した。赤外分光法で、約 $1820\text{ cm}^{-1}$ におけるアズラクトンカルボニル吸収帯の強度を約 $1640\text{ cm}^{-1}$ におけるアミドカルボニル吸収帯と比較することにより、様々な架橋剤との反応の程度を検証した。これらの結果は、全て、二級アミンを使用してアズラクトン官能基との架橋反応速度を制御できることを表す。

#### 【0043】

##### 実施例6

###### ゲル形成に関する追加実験

マイクロ遠心管を容器として使用し、ゲルの形成について多くの実験を実施した。固体分1.0%～固体分20%の範囲の様々なポリマー溶液を調製した後、これらを様々な架橋剤（別々の架橋剤をそれぞれ様々な量で使用）と反応させ、ゲル化時間を記録した。使用したコポリマー溶液には、次のものが含まれた：

a) 95:5、90:10、および70:30 w/wのp（アクリルアミド/VDM）の水溶液  
20

b) 80:20 w/wのポリ(DMA/VDM)のイソプロパノール溶液。

架橋剤には、次のものが含まれた：

- a) アミノプロピルトリメトキシシラン
- b) 1.0Mのエチレンジアミンのエタノール溶液
- c) 10% w/wのPEIのメタノール溶液
- d) ポリリシンの水溶液。

混合後、数分から数時間のゲル化時間が得られ、ポリマーの固体分%、および添加される架橋剤の量を変えることによって制御することができた。これらの同じ変数が形成したゲルの硬さに影響を与えた。

#### 【0044】

##### 実施例7

###### マイクロ複製フィルムのコーティング

1mm間隔で配置され、フィルムの長さに沿って延びる、断面寸法が約 $1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ のチャネルが25本ある、幅約5.5cmのマイクロ複製されたポリプロピレンフィルムを基材として使用した。実施例5に記載されるものと類似のポリマーAのコーティング溶液を数種類、調製し（固体分1～15%の範囲で、1～10%の架橋剤を含有する）、シリンジで基材のチャネルに塗布した。コーティングを架橋させ、乾燥させた後、コーティング済みの基材を脱イオン水中に入れ、再び水和させた。多くの場合、ゲルが膨潤してチャネルから飛び出すのが観察され、そのため、基材に対する接着力が弱いことが示された。この問題を最小限にするため、基材を1% w/wのポリエチレンイミン(PEI)のメタノール溶液中でディップコーティングすることにより、プライマー処理し、続いて一晩、周辺温度で乾燥させた。固体分が5%および10%で、2.5%、5%、および10%の架橋剤を有する新しいコーティング溶液を塗布し、ゲル化させた。ゲルは、脱イオン水で調べた場合、幾分膨潤したが、チャネル内に残っているのが観察された。

#### 【0045】

##### 実施例8

###### マイクロ複製フィルム上でのタンパク質の固定化

実施例7のPEIプライマー処理した基材を使用し、5%エチレンジアミンを架橋剤として配合した固体分5%のコポリマーに由来するゲルでチャネルを充填した。別々のコーティング済みの基材を個々に、次のタンパク質カップリング溶液中に30分～1時間浸漬し

10

20

30

40

50

た：(a) 1.0M 硫酸ナトリウムを含有するリン酸塩で緩衝された塩水(PBS)(pH 7.5)中で、5mg/ml のウシ血清アルブミン溶液；(b) 1.0M クエン酸塩(citrate)を含有する0.1Mの2-[N-シクロヘキシルアミノ]エタンスルホン酸(Ches)(pH 9.0)中で、5mg/ml のミオグロビン溶液；(c) 0.9M 硫酸ナトリウムを含有するPBS(pH 7.5)中で、1mg/ml のタンパク質A溶液。カップリング後、PBS中で、1.0Mの塩化ナトリウム溶液を用いて基材を完全に洗浄し、共有結合していないタンパク質を全て除去した。

#### 【0046】

タンパク質カップリングを次のように評価した：

(a) コーティング済みの基材をミオグロビンと反応させ、前述のようにカップリングさせた後、光学顕微鏡で観察した。コーティング済みの基材は、チャネル内に赤茶色の染みのあるゲルを含有し、ミオグロビンがカップリングしたことを示した。10

(b) コーティング済みの基材をミオグロビンと反応させ、BCAタンパク質分析試薬(イリノイ州ロックフォード、ピアス・ケミカル社(Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois))の溶液中に入れた。深紫色の形成は、カップリングしたタンパク質の存在を示した。

(c) タンパク質Aと反応したコーティング済みの基材と、アルブミンと反応したコーティング済みの基材を、ウサギIgG FITC(フルオレセインイソチオシアネート)抱合体(ミズーリ州セントルイス、シグマ・ケミカル社(Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri))をPBS中で希釈した溶液中に別々に浸漬させた。コーティング済みの基材をPBSで洗浄した後、結合した蛍光を顕微鏡で観察した。タンパク質Aと反応したコーティング済みの基材は、強い蛍光信号を示し、そのため、IgGがタンパク質Aに結合していることを示した。アルブミンと反応したコーティング済みの基材は、蛍光信号を示さなかった。タンパク質Aがカップリングしたゲルの蛍光強度を、488ナノメータレーザー、フルオレセインフィルタ、および光電子増倍管を装備したレーザー走査デバイスを使用して測定した場合、強度はバックグラウンド(コーティングされていないプラスチック)より74,300RLU(相対的光単位)上回ることが分かった。タンパク質に暴露されなかった対照サンプルも、結合した蛍光を示さなかった。20

#### 【0047】

ずっと小さい「V字形の溝」のチャネルを有するマイクロ複製フィルムでこれらの実験を繰り返した場合、同様の結果が得られた。これらのマイクロチャネルは、底辺が約0.3mmで、高さが約0.35mmの三角形の断面を有する。30

#### 【0048】

##### 実施例9

アズラクトンポリマーを用いたスライドガラスのコーティング

アズラクトン/ジメチルアクリルアミドコポリマーを3-アミノプロピルトリメトキシラン(APTMS)と予備混合した後、スライドガラスにコーティングした。APTMSのアミノ基は、コポリマーのアズラクトン基と反応することができ、APTMSのトリメトキシシリル(TMS)基は、ガラスと反応することができる。TMS基の幾つかは、また、他のTMS基と反応し、その結果、架橋が起こる。40

#### 【0049】

スライドガラスの準備：

艶消し(frosted-ended)スライドガラスを1M水酸化ナトリウム溶液に入れ、10分間浸漬させた。スライドをピンセットで取り出し、蒸留水を流して洗浄し、過剰な水酸化ナトリウムを全て除去した。次いで、スライドを1MのHCl中に浸し、穏やかに揺らすか、又は時々攪拌して少なくとも10分間浸漬させた。最後に、蒸留水を流してスライドを洗浄し、HClを全て除去し、メタノールですすぎ、オープン中に入れて乾燥させた(50~70)。

#### 【0050】

10

20

30

40

50

## 溶液：

1. ポリマー溶媒：20:1のIPA:MEK (IPAを200mL、およびMEKを10mL)
2. ポリマー溶液：MEK中で固体分40%に調製した、50:50w/wのDMA/VDMコポリマーの原料溶液をポリマー溶媒を使用して固体分2%、5%、および10%に希釈した。
3. APTMS：この試薬を希釈せずに、又は1:10にポリマー溶媒で希釈して使用した。使用直前に、APTMS、1mLをポリマー溶媒9mLと混合し、密封したガラスバイアル瓶中に保管した。
4. フルオレセインカダベリン：50mMのAMPSO緩衝液(pH9.5)中で、1M 10の硫酸ナトリウム溶液中で、100ug/mLのフルオレセインカダベリン。

## 【0051】

## スライドコーティング：

コーティング溶液を表2に示すように、コーティング直前に調製した。2枚のスライドを列挙した各溶液でコーティングし、洗浄済みのスライドを1枚、ブランクとして保管した(全部で13枚のスライド)。コーティングは、14番のワイヤを巻き付けたコーティングロッドで達成された。コーティング済みのスライドを50°のオーブンで10分間、又は完全に乾燥するまで乾燥させた。

## 【0052】

## 【表2】

20

表2.

コーティング溶液	2%コポリマー(mL)	5%コポリマー(mL)	10%コポリマー(mL)	未希釈のAPTMS(μL)	1:10に希釈したAPTMS(μL)
B1 : 2%コポリマー 5%架橋剤	10				140
B2 : 2%コポリマー 10%架橋剤	10				280
B3 : 5%コポリマー 5%架橋剤		10			350
B4 : 5%コポリマー 10%架橋剤		10		70	
B5 : 10%コポリマー 5%架橋剤			10	70	
B6 : 10%コポリマー 10%架橋剤			10	140	

30

40

## 【0053】

## フルオレセインカダバリンとの反応：

反応性アズラクトン官能基の存在を検証するため、コーティング済みのスライドをフルオレセインカダバリンとの反応により評価した。水に浸漬したろ紙を、13枚のペトリ皿の

50

それぞれの底部に入れた。コーティング済みの各スライドを別々のペトリ皿の中の湿ったろ紙の上に、コーティングされた側を上にして入れた。各スライドの上に 2  $\mu$  l、5  $\mu$  l、および 7  $\mu$  l のフルオレセインカダバリン溶液をそれぞれ 2 箇所配置し、それらの箇所が分離した状態を維持するように注意した。次いで、各ペトリ皿を被覆し、周辺温度で一晩放置した。各スライドを脱イオン水、続いて 5 % の SDS 溶液、脱イオン水、最後に pH 9.5 の AMPSO 緩衝液でよく洗浄した。洗浄後、顕微鏡で全スライドを検査し、蛍光の強度、および基材に対する接着の質を記録した。配合物は全て、蛍光アミンの良好な結合を示したが、B1、B3 および B5 は、他の配合物ほど良好な接着を見せなかった。ブランクは、蛍光を示さなかった。

## 【0054】

10

## 実施例 10

実施例 1 の 70 : 30 w / w のポリ(DMA / VDM)コポリマーを使用して実施例 9 を繰り返した。この場合、配合物は全て優れた接着および染料結合を示したが、ブランクは、ここでも、蛍光を示さなかった。

## 【0055】

## 実施例 11

スライドガラスの替わりにポリカーボネートフィルムを基材として使用し、実施例 10 を繰り返した。結果は実施例 10 で観察されたものと同様であった。

## 【0056】

20

## 実施例 12

## 粒子状基材のコーティング

実施例 5 のポリマー B に類似の、70 : 30 w / w の DMA と VDM とのコポリマー(イソプロパノール / トルエン中で固体分 22.3 % の溶液、0.9 g)を IPA で 25.5 ml に希釈し、固体分 1 % の溶液が得られた。10 % の架橋を形成するようにエチレンジアミン(4.8  $\mu$  l)を添加した。得られた溶液を丸底フラスコ中で、5.0 g のポロス(POROS)50-R2(多孔質の架橋スチレン - ジビニルベンゼンクロマトグラフィービーズ、マサチューセッツ州フラミンガム、ペーセプティブ・バイオシステム社(PerSeptive Biosystems, Inc., Framingham, MA))と混合した。混合物をロータリーエバポレータにかけて、真空下で濃縮し、乾燥させた。コーティング済みの粒子の拡散反射赤外分析は、約 1650 および 1820 cm<sup>-1</sup> で、それぞれ、コポリマーのアミドおよびアズラクトンカルボニル伸縮を示す吸収を示した。

30

## 【0057】

1.0 M クエン酸塩(citrate)を含有する 0.1 M の CHESS(pH 9.0) 中で、5 mg / ml のミオグロビン溶液と、0.1 質量 % のトゥイーン(TWEEN)20 洗剤とからなるタンパク質カップリング溶液を調製した。コーティング済みのビーズ 30 mg をタンパク質溶液 5 ml と混合した。別の反応で、タンパク質溶液を添加する前に、コーティング済みのビーズ 30 mg をメタノール 0.1 ml で予め湿らせた。ビーズをタンパク質カップリング溶液と 1 時間、逆さまにして(end-over-end)混合し、反応させた。1 % の SDS 溶液(3 ml)を各反応に添加し、更に 30 分間混合を続けた。混合物を遠心分離し、上澄み液の吸収を 532 nm で測定し、タンパク質溶液 5 ml を SDS 溶液 3 ml と混合することにより調製した標準と比較した。上澄み液の吸収から、最初の実験のビーズは、ビーズ 1 グラム当り 27.9 mg のミオグロビンがカップリングし、メタノール存在下のビーズは、ビーズ 1 グラム当り 38.0 mg のミオグロビンがカップリングしたと計算された。対照のコーティングされていないビーズは、ミオグロビンのカップリングを示さなかった。

40

## 【0058】

類似の実験では、エチレンジアミン又は APTMS のいずれかを架橋剤として使用し、多孔質および無孔質のシリカビーズをアズラクトン官能性コポリマーでコーティングした。

## 【0059】

## 実施例 13

50

### 不織ウェブのコーティング

I P A 中でフリーラジカル重合により調製された、70 : 30 w / w のポリ(D M A / V D M)に由来するヒドロゲルで様々な不織ウェブをコーティングし、エチレンジアミン(ED)又はN-エチルエチレンジアミン(N-EED)のいずれかと10質量%の濃度で架橋した。このコポリマーを架橋剤と配合する前に、I P A で固体分1.5%又は3.0%のいずれかに希釀した。使用した不織ウェブは、市販のスパンボンドナイロン(ナイロン)、ポリブチレンテレフタレート(P B T)、ポリエチレンテレフタレート(P E T)、又はポリプロピレン(PP)のサンプルであった。不織ウェブのサンプルを30分間コーティング溶液中に浸漬し、ワイプ(ニュージャージー州アッパーサドルリバー、テクスワイプ社(Texwipe Co., Upper Saddle River, NJ))で軽く叩いて乾かし、50のオーブンで30分間乾燥させた。コーティングに続いて、アズラクトンを一级アミンに転換した後、製造業者の使用説明書に従って、市販のニンヒドリン分析キット(カリフォルニア州フォスター・シティ、アプライド・バイオシステムズ社(Applied Biosystems Corp., Foster City, California))を使用してアミン含量を測定することにより、利用可能なアズラクトン官能基の量を決定した。この分析のため、秤量したコーティング済み不織ウェブのサンプルを0.5MのEDのI P A 溶液と30分間反応させ、次いで、ニンヒドリン分析を開始する前に、ジメチルホルムアミド、脱イオン水、およびエタノール、それぞれ1回分3~15mlで連続的に洗浄した。結果を表3に列挙する。

【0060】

【表3】

表3. コーティング済みの不織ウェブの官能基

実施例	不織ウェブ	ウェブ密度 (g/m <sup>2</sup> )	固体分 %	架橋剤	アミン含量 (nmol/mg)
13a	ナイロン	なし	3.0	ED	21
13b	PBT	41.2	3.0	ED	93
13c	PET	35.0	3.0	ED	104
13d	PP	15.0	1.5	ED	69
13e	PP	15.0	3.0	ED	148
13f	PP	15.0	1.5	N-EED	47
13g	PP	15.0	3.0	N-EED	93

【0061】

実施例14

### 配向ポリマーフィルムのコーティング

小型化アレイを調製する目的のため、本発明の組成物を二軸配向ポリエチレンフィルムにコーティングすることが、国際公開第W O 9 9 / 5 5 3 1 9号明細書に報告されている。

【0062】

コーティング前に、既知の技術に従い、基材フィルムをコロナ処理した。架橋剤として10質量%の1,2-エチレンジアミン(ウィスコンシン州ミルウォーキー、オールドリッチ・ケミカル社(Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin))を有し、イソプロパノールで調製され希釀された、70 : 30 w / w のポリ(D M A / V D M)を用いた押し出しダイコーティングで、基材をコーティングした。別の基材は、コーティングをメチルエチルケトン中で調製し、希釀したこと以外、同様に処理され、コーティングされた。以下のように、各基材の安定性を試験した。

10

20

30

40

50

**【 0 0 6 3 】**

5 0 mM のリン酸ナトリウム緩衝液は、1 % ( w / w ) ドデシル硫酸ナトリウム ( S D S ) の脱イオン水溶液を用いて pH 8 . 3 8 に調製された。基材を 8 0 の緩衝液に 5 時間浸漬した。コーティングの存在を検出するため、減衰全反射 ( A T R ) I R 分光法を使用して基材を分析した。

**【 0 0 6 4 】**

イソプロパノール中で調製されたコーティングは、メチルエチルケトン中で調製されたコーティングより良好な接着を提供した。国際公開第 W O 0 1 / 1 6 3 7 0 号明細書に記載されているものなどの、IPAベースのコーティングを金属コーティング済みの配向フィルムに塗布することにより、基材が弛緩する前でさえ、更に良好な安定性が得られる。

10

**【 0 0 6 5 】**

本発明の範囲および趣旨を逸脱することなく、本発明に対する様々な変更および変形が当業者には明らかである。本発明は、本明細書に記載される例示的な実施形態および実施例によって不当に限定されるものではなく、このような実施例および実施形態は、例として表されるに過ぎず、本発明の範囲は、前述の特許請求の範囲によってのみ限定されるものとすることを理解すべきである。

## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
28 November 2002 (28.11.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/094890 A1

(51) International Patent Classification: C08F 8/32, 220/56, 226/06, C09F 133/26, C08J 9/12, 3/24, C12N 11/08, C08K 5/17, 5/5455, C08L 33/26

(21) International Application Number: PCT/US02/05433

(22) International Filing Date: 22 February 2002 (22.02.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
09/860,944 18 May 2001 (18.05.2001) US

(71) Applicant: 3M INNOVATIVE PROPERTIES COMPANY [US/US]; 3M Center, Post Office Box 33427, Saint Paul, MN 55133-3427 (US).

(72) Inventors: HADDAD, Louis, C.; Post Office Box 33427, Saint Paul, MN 55133-3427 (US). HEMBRE, James, I.; Post Office Box 33427, Saint Paul, MN 55133-3427 (US). RASMUSSEN, Jerold, K.; Post Office Box 33427, Saint Paul, MN 55133-3427 (US). SARPONG, Daniel; Post Office Box 33427, Saint Paul, MN 55133-3427 (US).

(74) Agents: GRAM, Christopher, D. et al.; Office of Intellectual Property Counsel, Post Office Box 33427, Saint Paul, MN 55133-3427 (US).

(81) Designated States (national): AI, AG, AI., AM, AT (utility model), AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CI, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), CZ, DE (utility model), DE, DK (utility model), DK, DM, DZ, EC, EE (utility model), EL, ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GL, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, ME, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PL, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

## Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/094890 A1

(54) Title: AZI-LACTONE-FUNCTIONAL HYDROPHILIC COATINGS AND HYDROGELS

(57) Abstract: Surface coatings including azlactone-functional hydrogels and articles with the coatings disposed thereon are disclosed. Methods of making the coating and controlling the gelation time of the hydrogels are also disclosed.

WO 02/094890

PCT/US02/05433

**AZLACTONE-FUNCTIONAL HYDROPHILIC COATINGS  
AND HYDROGELS**

**Field of the Invention**

5 This invention relates to porous, hydrogel coatings useful for the immobilization of biologically active molecules and, particularly, to crosslinked, azlactone-functional hydrogel coatings that are useful for the preparation of DNA and protein arrays, diagnostic devices and materials for the separation of biological species. More particularly, this invention relates to porous hydrophilic, crosslinked, azlactone-functional coatings and gels.

10

**Background**

Coatings derived from copolymers of polymerizable azlactones and olefinically unsaturated monomers are known. Such coatings are derived, in general, from rigid, high glass transition temperature ( $T_g$ ), hydrophobic copolymers. Crosslinking is accomplished by dispersing or dissolving the azlactone copolymer with a crosslinking agent, generally in an approximately stoichiometric amount to the azlactone, in a volatile organic liquid, applying the mixture to a substrate, then allowing the coating to crosslink via azlactone ring-opening reactions with the crosslinking agent. Suitable crosslinkers are polyols and polyamines. Polyamines, such as ethylene diamine, react with azlactones at room temperature, thereby forming crosslinks. Because of the rapid reaction between azlactones and primary amines, incorporation of a ketone solvent in the coating mixture is desirable. Polyols react much slower with azlactones and generally require a catalyst, such as a strongly acidic or basic catalyst, to promote crosslinking.

Various coatings derived from azlactone copolymers are known. For example, known coatings include copolymers of 2-alkenylazlactones with acrylic acid esters and copolymerizable vinylidene compounds having at least one hydroxyl group that crosslink on drying or mild heating. Such polymers crosslink by reaction of the hydroxyl groups on one chain of the polymer with azlactone groups on other chains. In general, an acidic or basic catalyst is again needed to facilitate the crosslinking reaction. Coatings derived from azlactone copolymers that are crosslinkable by exposure to radiation are useful in imaging applications. Uncrosslinked azlactone copolymers may be used to coat a variety of substrates. These coated substrates can be used for the immobilization of functional

WO 02/094890

PCT/US02/05433

materials, including biologically active species such as proteins. Crosslinked azlactone-functional moieties may be included in a coating over the surfaces of chemically reactive, porous supports. These reactive supports can, in turn, be reacted with biologically active materials to produce adduct supports.

5 While there are a variety of methods for producing coatings derived from azlactone-functional materials, some of which provide azlactone-functional coatings useful for the immobilization of other species, there remains a need for additional or improved methods for providing coated materials for use in the immobilization of biologically active materials.

10

#### Summary

This invention relates to the preparation of reactive hydrophilic coatings and hydrogels that can be applied to various substrates for the purpose of covalently attaching a functional material to the substrate. In particular, the invention provides a crosslinked hydrogel for coating a substrate comprising at least one azlactone-functional copolymer comprising a plurality of azlactone moieties, a plurality of azlactone functional groups, and at least one comonomer, and at least one crosslinker comprising a first moiety and a second moiety, wherein the first moiety of a first crosslinker is covalently bound to a first azlactone moiety and the second moiety of the first crosslinker is covalently bound to a second azlactone moiety or a second crosslinker.

15 In some embodiments of the crosslinked hydrogel of the present invention, the second moiety of the first crosslinker is covalently bound to a second azlactone moiety. In such embodiments, the first crosslinker may be a primary polyamine, a polyether polyamine, a compound containing both a primary and a secondary amine, or any other suitable crosslinker. In other embodiments, the second moiety of the first crosslinker is covalently bound to a second crosslinker molecule. In such embodiments, the first crosslinker may be bound to a second crosslinker molecule having the same chemical structure as the first crosslinker. Alternatively, the first crosslinker may be bound to a second crosslinker having a different chemical structure than the first crosslinker. In 20 either embodiment described above, the first crosslinker, the second crosslinker, or both 25 may be a heterobifunctional crosslinker such as an aminoalkylalkoxysilane.

WO 02/094890

PCT/US02/05433

In some embodiments of the present invention, the crosslinked hydrogel includes polymers made from ionic or non-hydrophilic comonomers.

### **Detailed Description of the Invention**

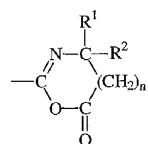
5 This invention relates to the preparation of reactive hydrophilic coatings and hydrogels that can be placed on the surfaces of various substrates or within the structures of various structured (i.e., macro- or microstructured) substrates for the purpose of covalently attaching a functional material to the substrate. More specifically, the present invention provides compositions and processes for applying coatings including azlactone functionality onto substrate surfaces. The coatings may include thin films, thick gels, or any intermediate thickness. These coatings may provide for the attachment of functional materials to the substrate. A "functional material" is any chemical species having (a) a nucleophilic group that can react with an azlactone and (b) another reactive site, which is desired to be attached to the substrate to accomplish a specific purpose. In certain 10 embodiments of the present invention, the functional material includes a biologically active material.

15

For the purposes of this invention, the following definitions shall have the meanings set forth.

<sup>20</sup> “1°/2° amine-containing compound” as used herein shall mean any compound, molecule, composition or complex having one primary amine-containing functional group and at least one secondary amine-containing functional group.

"Azlactone functional group" shall mean a functional group having the structure:



wherein R<sup>1</sup> and R<sup>2</sup> are, independently, an alkyl group having 1-14 carbon atoms, a cycloalkyl group having 3-14 carbon atoms, an aryl group having 5-12 ring atoms, an aryl group having 6-26 carbon atoms and 0-3 S, N, or nonperoxidic O atoms, or R<sup>1</sup> and

WO 02/094890

PCT/US02/05433

R<sup>2</sup> taken together with the carbon to which they are both joined form a carbocyclic ring having 4-12 carbons, and n is the integer 0 or 1.

“Functional group” as used herein shall mean a combination of atoms in a molecule, compound, composition or complex that tends to function as a single chemical entity. Examples of functional groups include, but are not limited to, -NH<sub>2</sub> (amine), -COOH (carboxyl), siloxane, -OH (hydroxyl), and azlactone. For example, prior to reaction, certain crosslinkers may contain one or more amine functional groups and certain copolymers may contain one or more azlactone functional groups.

“Heterobifunctional” as used herein shall mean, with respect to any molecule, compound, composition or complex, having more than one functional group and having at least two functional groups that are different from one another. For example, an amino acid is heterobifunctional because it contains two functional groups, the amino group and the carboxyl group, that are different than one another.

“Hydrogel” means a water-containing gel, i.e., a polymer that is hydrophilic and will absorb water, yet is insoluble in water.

“Ionic,” with respect to monomers, shall be construed broadly to refer to monomers that inherently have a formal charge as well as monomers that are acidic or basic enough that they can acquire a formal charge when in contact with an aqueous medium.

“Moiety” as used herein shall mean the portion of a functional group from a first reactant that combines with a functional group of a second reactant to form a covalent bond in the reaction product. For example, in a peptide bond, the -NH- that participates in the peptide bond remains from the amine functional group of one amino acid and is therefore considered, herein, to be an amine moiety in the peptide product. The -C=O that participates in the peptide bond remains from the carboxylic acid functional group of the second amino acid and is therefore considered a carboxyl moiety in the peptide product.

“Non-hydrophilic” as used herein shall refer, with respect to any molecule, compound, composition or complex, to any material that has a Hydrophilicity Index of less than about 40.

“Pot life” shall mean the length of time during which a coating formulation remains soluble and homogeneous with low attendant viscosity.

WO 02/094890

PCT/US02/05433

"Primer" shall mean any suitable material that promotes or improves adhesion between the copolymer and the substrate. "Primer" shall include both inert primers and reactive primers. Inert primers act as an adhesion-promoting interlayer between the copolymer and the substrate. Reactive primers form covalent bonds between the copolymer and the substrate to improve adhesion.

The azlactone-functional hydrogel coatings of the present invention are produced by first preparing a solution of a hydrophilic, azlactone-functional copolymer. This copolymer is then formulated with an appropriate crosslinker, and the mixture is then coated on or applied to an appropriate substrate. The crosslinker reacts with a portion of the azlactone groups of the copolymer, thereby forming the porous, crosslinked hydrogel. Unreacted azlactone groups in the hydrogel coating are then available for the attachment of functional materials for the appropriate end uses.

Azlactone-functional copolymers may be prepared by a variety of free radical polymerization processes in which alkenyl azlactone monomers are copolymerized with comonomers. Typical solution polymerization processes have been reported, for example, in U.S. Pat. No. 4,304,705, issued to Heilmann et al. and U.S. Pat. No. 3,583,950, issued to Kollinsky et al. For the purposes of this invention, suitable comonomers include, without limitation, hydrophilic or water-soluble monomers such as acrylamide, methacrylamide, N-mono- and N,N-disubstituted acrylamides and methacrylamides, N-vinylamides such as N-vinylformamide and N-vinylpyrrolidinone, and hydroxyalkylacrylates and acrylamides such as 2-hydroxyethylmethacrylate and N-acryloyl-trishydroxymethylaminomethane. For many applications, uncharged copolymers may be desirable in order to reduce the possibility for nonspecific binding of biological macromolecules to the coatings. For specific applications, however, ionic comonomers may also be incorporated into the copolymers. Ionic monomers may be anionic or cationic. Anionic monomers include unsaturated acids and their metal salts, such as acrylic, methacrylic, maleic, fumaric, and itaconic acids, vinyl phosphoric and phosphonic acids, styrenesulfonic acid, and 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid; cationic monomers include amine-containing monomers such as 2-, 3- or 4-vinylpyridine, (3-acrylamidopropyl)trimethylammonium chloride, 2-diethylaminoethylacrylate and methacrylate, 3-dimethylaminopropylacrylate and methacrylate, and similarly substituted acrylamides and methacrylamides.

WO 02/094890

PCT/US02/05433

Copolymers within the scope of this invention also may include non-hydrophilic comonomers. As used herein, non-hydrophilic comonomers include any comonomer that has a Hydrophilicity Index of less than about 40. The Hydrophilicity Index (or "H.I.") is an empirical concept that may be useful for describing the hydrophilic character of monomers suitable for use in the present invention. H.I. is defined as:

- $$\text{H.I.} = \frac{\text{total molecular weight of all hydrophilic groups in the monomer}}{\text{molecular weight of the monomer}} \times 100.$$
- 10 Hydrophilic groups are generally those that are functionally capable of forming hydrogen bonds with water. Examples of hydrophilic groups include, but are not limited to, -N-, -NH-, -NH<sub>2</sub>-, -O-, -OH, -COOH, -C=O, -OC=O, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>M<sup>+</sup> (wherein M<sup>+</sup> is an alkali or alkaline earth metal cation), -SH, SO<sub>3</sub>H, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>M<sup>+</sup>, -NHCONH-, and other ionic functional groups.
- 15 Non-hydrophilic comonomers may be incorporated at less than about 50% by weight and still maintain sufficient hydrophilicity of the coatings and help minimize nonspecific binding. Certain embodiments incorporate non-hydrophilic comonomers at less than about 30% by weight. Suitable non-hydrophilic comonomers include, without limitation, known acrylate and methacrylate esters, styrene, and other free radically polymerizable monomers.
- 20 Once the appropriate azlactone-functional copolymer has been prepared, coating mixtures are formulated by adding crosslinkers to the copolymer. This is conveniently done in an appropriate organic solvent that is nonreactive with azlactone functional groups. The copolymer may be diluted with solvent to a concentration of about 5% by weight or less prior to the addition of crosslinker. In other embodiments, the copolymer may be diluted with solvent to concentrations of about 10% by weight or about 20% by weight prior to the addition of crosslinker. The solvent used for dilution may be the same solvent in which the copolymer was prepared or may be one or more different solvents. Crosslinking, or gellation time, is conveniently controlled by copolymer concentration and 25 the amount of crosslinker added, thereby allowing adequate time for coating or for filling structures, followed by rapid cure time to provide finished product. In general, the lower
- 30

WO 02/094890

PCT/US02/05433

the copolymer concentration or the lower the amount of crosslinker, the longer it will take for the crosslinking/gellation to occur.

Crosslinkers useful for the purposes of the present invention include, without limitation, materials that include nucleophilic groups that will undergo ring-opening reactions with azlactone functional groups. Suitable crosslinkers include primary polyamines, such as ethylenediamine, 1,3-propanediamine, 1,3-diamino-2-hydroxypropane, 1,6-hexanediamine, tris-(2-aminoethyl)amine, and the like; and polyetherpolyamines, such as 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine, 3,6-dioxa-1,8-diaminoctane, amine-terminated polyethyleneglycol and polypropyleneglycol homopolymers and copolymers, and the like. To achieve the purposes of the invention, the stoichiometry between the nucleophilic groups of the crosslinker and the azlactone functional groups of the copolymer should be less than 1:1 so that the final crosslinked hydrogel still contains reactive azlactone functionality. Thus, the azlactone content in the original copolymer will provide an upper limit on the amount of crosslinker that may be added to the coating formulation. The intended final use of the hydrogel may also dictate, to a certain degree, the amount of crosslinker used in the formulation. The amount of crosslinking will influence the swelling and porosity of the hydrogel, thus affecting the rate of diffusion of reagents or target molecules into and out of the hydrogel. Generally, less crosslinking provides a hydrogel having larger pores, thereby allowing diffusion of larger biological macromolecules through the hydrogel.

As indicated above, gellation time can be controlled to a certain extent by controlling the concentrations of copolymer and crosslinker. As used herein, gellation time refers to the amount of time necessary for a solution that can form a gel to become no longer fluid. In many instances, these parameters provide adequate control to allow placing the coating solution into the proper configuration prior to the occurrence of gellation. For some applications or product concepts, however, these parameters by themselves do not allow long enough gel times for use in manufacturing. Through the use of some novel crosslinking schemes, the present invention now provides coating formulations with extended pot lives; that is, the coating formulations remain soluble and homogeneous with low attendant viscosities for extended periods of time. Upon evaporation of the solvent and/or raising the temperature of the coated substrate, the coating formulations crosslink to produce the hydrogels of the present invention. These

WO 02/094890

PCT/US02/05433

novel crosslinking schemes are achieved by using heterobifunctional crosslinkers, i.e., crosslinkers that have one nucleophilic functional group that reacts with the azlactone group at ambient temperature in solution (e.g., a primary amine) and at least one other functional group that can lead to a crosslinking reaction upon removal of the solvent or upon raising the temperature. One class of crosslinker that may be used in this manner is the aminoalkylalkoxysilanes such as, for example, 3-aminopropyltrimethoxysilane, 3-aminopropyltriethoxysilane, N-[3-(trimethoxysilyl)propyl]ethylenediamine, or other aminoalkylmono-, di- and tri-alkoxysilanes. The amino group undergoes a ring-opening addition reaction with an azlactone group, providing a pendant alkoxysilane group on the copolymer. Upon dry-down, the alkoxy groups may be hydrolyzed and subsequently form siloxane crosslinks between polymer chains. Depending upon the nature of the substrate, covalent bonds may simultaneously be made with functional groups on the surface of the substrate (for example, if the substrate is siliceous, siloxane linkages to the substrate may be formed).

Another class of crosslinking agents useful for prolonging pot life or gellation times includes primary/secondary (1<sup>st</sup>/2<sup>nd</sup>) amine-containing compounds. In these materials, the primary amine provides rapid reaction with an azlactone group on the copolymer at room temperature, while the secondary amine is relatively slow to react. Removing the solvent, raising the temperature of the coated article, or both allows the secondary amine to react to form the hydrogel. Suitable 1<sup>st</sup>/2<sup>nd</sup> amine-containing compounds include, without limitation, N-methyl-1,2-ethanediamine, N-ethyl-1,2-ethanediamine, N-isopropyl-1,2-ethanediamine, and other N-alkyldiaminoalkanes. Increasing the steric bulk of the N-alkyl substituent provides a greater barrier to reaction of the secondary amino group, thus necessitating a higher temperature to produce crosslinking.

Once formulated, the coating solutions can be applied to desired substrates and dried (optionally with the application of heat) to produce the hydrogels of the present invention. Coating methods can vary widely depending upon the particular substrate, and may be selected from methods known in the art. These include, for example, extrusion coating, die coating, dip coating, air-knife coating, gravure coating, curtain coating, spray coating, use of wire-wound coating rods, and the like.

WO 02/094890

PCT/US02/05433

With certain substrates, the hydrophilic azlactone-functional polymer will exhibit fairly good adhesion. Crosslinking to produce a hydrogel insolubilizes the coating and reduces the likelihood of the coating coming off of the substrate in subsequent manipulations. Adhesion of the coating to the substrate may be improved, if desired, by 5 any known method. Such methods include, but are not limited to, various pre-treatments to or coatings on the surface of the substrate, such as corona or plasma treatments, or by the application of primers. Suitable primers include, without limitation, polyethylenimine, polyvinylidenechloride, primers such as those reported in U.S. Pat. No. 5,602,202, issued to Groves, and colloidal dispersions of inorganic metal oxides in combination with 10 ambifunctional silanes such as those reported in U.S. Pat. No. 5,204,219, issued to Van Ooij et al., 5,464,900, issued to Stofko et al., and 5,639,546, issued to Bilkadi. Other methods of increasing adhesion to polyolefin substrates are reported in U.S. Pat. No. 15 5,500,251, issued to Burgoyne et al.

The hydrophilic coatings and hydrogels of the invention may be applied to a wide 15 variety of substrates. The substrates may be natural or synthetic, organic or inorganic, porous or nonporous, flat and substantially featureless or highly structured. The substrates may be film-like, particulate-like, or molded plastic articles. Suitable substrates include, without limitation, standard 96-, 384-, or 1536-well plastic microtiter plates, including filtration plates; grooved, microreplicated films; microfluidic channels in microfluidic 20 devices; embossed or microstructured films; tubes or capillaries; spin tubes or spin columns; glass, ceramic, or metal particles or fibers, including porous particles or fibers; porous or nonporous polymeric fibers or particles, such as chromatographic particles; oriented or non-oriented polymeric films; woven or nonwoven webs (such as fibrous webs); porous or microporous membranes; and the like.

25 The substrate chosen will depend upon the intended application or device. Those applications include, without limitation, devices such as DNA or protein arrays; biological assay or diagnostic devices; capillary electrophoresis, electrochromatography, or other separation devices; chromatographic supports for affinity, ion exchange, hydrophobic interaction, or other types of separations and purifications; cell selection or separation 30 devices; and the like. For example, when using oriented polymeric films as the substrate, the coatings of the invention are advantageously used to prepare high-density, miniaturized arrays as described in International Publication Number WO 99/53319.

WO 02/094890

PCT/US02/05433

Once the reactive coatings or hydrogels are applied to the substrates, the residual azlactone functionality is available for reaction with the functional material. Again, the intended application will dictate the identity of the functional material. Preferred functional materials are biologically active materials such as proteins, enzymes, oligonucleotides, or any other species that may interact with biological species.

Derivatization may be conducted in aqueous, buffered media, as is well known for reactions of azlactone-functional substrates, although other media such as organic solvents may be used.

10

**Examples**

The following examples have been selected merely to further illustrate features, advantages, and other details of the invention. It is to be expressly understood, however, that while the examples serve this purpose, the particular ingredients and amounts used as well as other conditions and details are not to be construed in a manner that would unduly limit the scope of this invention.

15

**EXAMPLE 1.****Gel Formation in Microtiter Tray Format**

40% Solids solutions in methyl ethyl ketone (MEK) of 90:10 w/w and 70:30 w/w copolymers of dimethylacrylamide (DMA) and vinyldimethylazlactone (VDM) were prepared by standard free radical polymerization techniques. Portions of each were diluted with 20:1 v/v isopropanol:MEK to give solutions of 2.5% and 10% solids of each copolymer. Portions of each of these dilute solutions were then formulated with enough aminopropyltrimethoxysilane to react with and provide crosslink densities of 2.5% and 10% by weight, thus providing a total of 8 different formulations. These solutions were then deposited, using a micropipette, into the wells of a 384-well polypropylene microtiter tray. Some of the wells were left exposed to the ambient atmosphere while others were covered with Scotch Brand Magic Mending Tape (Minnesota Mining and Manufacturing Co., St. Paul, MN). The mixtures in the wells were observed to thicken and become gelled (crosslinked). Shrinkage was observed in the untaped wells due to solvent loss, however, swelling reoccurred upon addition of solvent or water. Upon removal of the tape from the taped wells, the gels were smoothly pulled out of the wells and remained tightly adhered

WO 02/094890

PCT/US02/05433

to the tape in a raised gel pattern. Except for the gels prepared from 90:10 poly(DMA/VDM)/10% crosslinker, all have residual azlactone functionality which can be used for covalent attachment of biological or other functional materials.

5

**EXAMPLE 2.****Formation of Gels in 96-Well Plate**

The formulations of Example 1 were used to fill wells (250 microliters each) in a commercial polystyrene 96-well microtitration plate. Because of the larger volume, longer gellation times were observed. Some of the gels could be pulled from the wells with tape as described in Example 1. Alternatively, addition of smaller amounts of solution, or of lower % solids solutions, allowed formation of thin coatings of azlactone-functional hydrogels on the interior surfaces of the microwells.

10

**EXAMPLE 3.****Formation of Reactive Coating within Wells of a 1536-well Plate**

A 40% solids solution (MEK) of 80:20 w/w poly(DMA/VDM) was diluted to 20% solids with isopropanol (IPA), formulated with enough ethylenediamine to provide a crosslink density of about 10% by weight, then applied to a commercial 1536-well plate. A windshield wiper blade was used to coat and force the solution into the wells. Upon drying, a reactive, azlactone-functional polymeric coating was obtained within the wells.

15

20

**EXAMPLE 4.****Formation of Thin, Reactive Coating in a Microfilter Tray**

A portion of polypropylene 384-well microtiter tray was cleaned by rinsing with methanol and isopropanol, then dried in an oven at 50°C for 5 minutes. 1 µl, 2 µl, 3 µl, 4 µl, 5 µl or 10 µl of 0.1% w/w polyethylenimine in deionized water were added to adjacent wells in each of two separate rows. A third row of wells was left untreated. The tray was dried in the oven again for 5 minutes. 2 microliters of 5% solids 70:30 poly(DMA/VDM) copolymer, prepared as in Example 1, was added to each well. The tray was again oven-dried for 5 minutes. A solution of 5-((5-aminopentyl)thioureidyl) fluorescein cadaverine (1 mg/ml in dimethylformamide, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) was diluted to a concentration of 20 micrograms/ml using a buffer consisting of 1 M sodium sulfate in 50

25

30

WO 02/094890

PCT/US02/05433

mM 3-[(1,1-dimethyl-2-hydroxyethyl)amino-2-hydroxypropanesulfonic acid (AMPSO), pH 9.0, in deionized water. 2 microliters of this dilute dye solution was added to each of the coated wells and allowed to dry. The tray was then washed thoroughly with deionized water, wetted with some of the above AMPSO buffer, and observed under short wavelength (254 nm) UV irradiation. All wells were examined for fluorescence. Green fluorescence within a well indicated that the fluorescein cadaverine had reacted with the azlactone copolymer coating and had become covalently bound within the well. The tray was then washed with the AMPSO buffer and reexamined. No fluorescence was observed in the untreated wells, indicating that the coating had not adhered to the copolymer and had been washed off with the AMPSO buffer. However, all wells primed with polyethylenimine still showed fluorescence, with the intensity increasing with increasing PEI level. The tray subsequently was washed with 1% w/w SDS (sodium dodecylsulfate) in deionized water and reexamined. No change was seen, indicating good adhesion and/or the PEI priming accomplished crosslinking.

The above experiment was repeated using a microtiter tray containing larger (ca. 8 mm x 8 mm square) wells, and larger volumes of the various solutions. Similar results were observed.

**EXAMPLE 5.****Effect of Solvent, Concentration, and Crosslinker on Gel Time**

The 70:30 w/w p(DMA/VDM) copolymer from Example 1 (Polymer A), prepared at 40% solids in MEK, was determined by gel permeation chromatography (GPC) to have a weight average molecular weight ( $M_w$ ) of 600,000. A similar copolymer (Polymer B) was prepared at 40% solids in toluene, and determined to have a  $M_w$  of 702,000. These two copolymer solutions were diluted with either methyl ethyl ketone (MEK) or isopropanol (IPA) to concentrations varying from 5-15% solids, then formulated with enough ethylenediamine to react with 1-10% by weight of the total monomer units in the copolymer. Gellation times (time at which the solution was no longer fluid) were observed. Results are listed in Table 1.

30

**Table 1. Hydrogel Formation**

Polymer	% Solids	Diluent	% ED	Gel Time
A	10	IPA	1	84 min
A	10	IPA	2.5	50 min
A	10	IPA	5	27 min
A	10	IPA	10	25 min
A	15	IPA	1	30 min
A	15	IPA	2.5	18 min
A	15	IPA	5	16 min
A	15	IPA	10	13 min
B	5	IPA	10	30 min
B	10	IPA	10	2.25 min
B	5	MEK	10	>48 hrs
B	10	MEK	10	60 min

These results illustrate control of gellation times and also demonstrate the inhibitory effect of MEK on the formation of crosslinked hydrogels.

5 Copolymer B was diluted with IPA to give polymer concentrations of 50 mg/ml and 100 mg/ml of solution, respectively. Samples of each solution (3 ml each) were formulated with enough diamine to provide 10% and 20% crosslinking. Diamines utilized were N-ethyl-1,2-ethanediamine, N-propyl-1,2-ethanediamine, and N-isopropyl-1,2-ethanediamine (N-EED, N-PED, and N-IED, respectively). Gellation times were observed  
10 at room temperature and at 65°C. No gellation was observed at room temperature over several days. At 65°C, gel times occurred in the following order: N-EED (fastest) > N-PED > N-IED. In a separate experiment, an IPA solution of copolymer B/10% N-EED was dried down at room temperature; the dry polymer readily re-dissolved upon addition of solvent. By contrast, a sample dried at 65°C would not redissolve, indicating that  
15 crosslinking had occurred at the elevated temperature. Infrared spectroscopy verified the extent of reaction with various crosslinkers by comparing the intensity of the azlactone carbonyl absorption band at about 1820 cm<sup>-1</sup> to the amide carbonyl band at about 1640 cm<sup>-1</sup>. All of these results illustrate that secondary amines can be used to control the rate of crosslinking reactions with azlactone functional groups.

20

WO 02/094890

PCT/US02/05433

**EXAMPLE 6.****Additional Experiments on Gel Formation**

- Numerous experiments were conducted on the formation of gels using microcentrifuge tubes as containers. Various polymer solutions were prepared varying from 1.0% solids to 20% solids, then these were reacted with a variety of crosslinkers (using varying amounts of each separate crosslinker), and the gellation times noted.
- 5 Copolymer solutions used included:
- a) 95:5, 90:10, and 70:30 w/w p(Acrylamide/VDM) in water;
  - b) 80:20 w/w poly(DMA/VDM) in isopropanol
- 10 Crosslinkers included:
- a) Aminopropyltrimethoxysilane
  - b) 1.0 M ethylenediamine in ethanol
  - c) 10% w/w PEI in methanol
  - d) Polylysine in water
- 15 Gellation times of minutes to hours after mixing were obtained, and could be controlled by varying polymer % solids and amount of crosslinker added. These same variables affected the stiffness of the gel that formed.

**EXAMPLE 7.****Coating of Microreplicated Films**

- 20 A microreplicated polypropylene film approximately 5.5 cm wide, containing 25 channels approximately 1 mm x 1mm in cross-sectional dimensions, spaced 1 mm apart, and running the length of the film, was used as the substrate. Several coating solutions of Polymer A similar to those described in Example 5 were prepared (varying from 1-15% 25 solids and containing 1-10% crosslinker), and were applied by syringe into channels of the substrate. After the coating was crosslinked and dried, the coated substrate was placed in deionized water to rehydrate the gels. In many instances, the gels were observed to swell and pop out of the channels, thereby indicating poor adhesion to the substrate. To minimize this problem, the substrate was primed by dip coating in a 1% w/w solution of 30 polyethylenimine (PEI) in methanol followed by drying at ambient temperature overnight. New coating solutions at 5% and 10% solids with 2.5%, 5%, and 10% crosslinker were

WO 02/094890

PCT/US02/05433

applied and allowed to gel. The gels were observed to remain in the channels when challenged with deionized water, even though they did swell somewhat.

**EXAMPLE 8.****Immobilization of Proteins on Microreplicated Films**

The PEI-primed substrate of Example 7 was used, and channels were filled with gels derived from 5% solids copolymer formulated with 5% ethylenediamine as crosslinker. Separate pieces of coated substrate were individually dipped in the following protein coupling solutions for 30 minutes to 1 hour: (a) 5 mg/ml bovine serum albumin in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.5, containing 1.0 M sodium sulfate; (b) 5 mg/ml myoglobin in 0.1 M 2-[N-cyclohexylamino]ethanesulfonic acid (CHES), pH 9.0, containing 1.0 M citrate; (c) 1 mg/ml Protein A in PBS, pH 7.5, containing 0.9 M sodium sulfate. After coupling, the substrates were washed thoroughly with 1.0 M sodium chloride in PBS to remove any noncovalently bound protein.

Protein coupling was evaluated as follows:

(a) A coated substrate was reacted with myoglobin, coupled as described above, and then observed with an optical microscope. The coated substrate contained reddish-brown stained gels in the channels, indicative of coupled myoglobin.

(b) A coated substrate was reacted with myoglobin and placed in a solution of BCA protein assay reagent (Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois). The formation of a deep purple color indicated the presence of coupled protein.

(c) A coated substrate that had been reacted with Protein A and a coated substrate that had been reacted with albumin were separately soaked in dilute solutions of rabbit IgG FITC (fluorescein isothiocyanate) conjugate (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) in PBS. The coated substrates were washed with PBS, then observed microscopically for bound fluorescence. The coated substrate that had been reacted with Protein A exhibited a strong fluorescent signal, thereby indicating that the IgGs had bound to the Protein A. The coated substrate that had been reacted with albumin exhibited no fluorescence. When the fluorescence intensity of the Protein A coupled gel was measured using a raster scanning device equipped with a 488 nanometer laser, fluorescein filters, and a photomultiplier tube, the intensity was found to be 74,300 RLU (relative light units) above background

WO 02/094890

PCT/US02/05433

(uncoated plastic). Control samples that had not been exposed to proteins also exhibited no bound fluorescence.

Similar results were obtained when these experiments were repeated on a microreplicated film having much smaller "V groove" channels. These microchannels had 5 a triangular cross section with a base of approximately 0.3 mm and a height of approximately 0.35 mm.

**EXAMPLE 9.****Coating glass slides with azlactone polymers**

Azlactone/dimethylacrylamide copolymer was premixed with 3-aminopropyltrimethoxysilane (APTMS) and then coated onto glass slides. The amino group of the APTMS is able to react with an azlactone group on the copolymer and the trimethoxysilyl (TMS) group of the APTMS is able to react with the glass. Also some of the TMS groups will react with other TMS groups, thereby resulting in crosslinking.

**Glass Slide Preparation:**  
Frosted-ended glass slides were placed in 1M sodium hydroxide and allowed to soak for 10 minutes. The slides were removed with forceps and washed under a stream of distilled water to remove all excess sodium hydroxide. The slides were then dipped in 1M HCl and soaked for at least 10 minutes with gentle rocking or occasional stirring. Finally, the slides were washed in a stream of distilled water to remove all of the HCl, rinsed with methanol, and placed in an oven to dry (50°-70°C).

**Solutions:**  
1. Polymer Solvent: 20:1 IPA:MEK (200 mL IPA and 10 mL MEK)  
2. Polymer solutions: A stock solution of 50:50 w/w DMA/VDM copolymer, prepared at 40% solids in MEK, was diluted to 2%, 5% and 10% solids using the Polymer Solvent.  
3. APTMS: This reagent was used undiluted or as a 1:10 dilution in Polymer Solvent.  
Just before use, 1 ml of APTMS was mixed with 9 ml of the Polymer Solvent and kept in a sealed glass vial.  
4. Fluorescein cadaverine: 100ug/mL of fluorescein cadaverine in a solution of 1M sodium sulfate in 50 mM AMPSO buffer at pH 9.5.

WO 02/094890

PCT/US02/05433

**Slide Coating:**

The coating solutions were prepared, as shown in Table 2, just before coating. Two slides were coated with each of the listed solutions, and one cleaned slide was kept as a blank (13 slides in all). Coating was accomplished with a number 14 wire-wound 5 coating rod. Coated slides were dried in the oven at 50° C for 10 minutes or until completely dry.

**Table 2.**

<b>Coating Solutions</b>	<b>2% copolymer (ml)</b>	<b>5% copolymer (ml)</b>	<b>10% copolymer (ml)</b>	<b>Undiluted APTMS (μl)</b>	<b>1:10 diluted APTMS (μl)</b>
B1: 2% copolymer, 5% crosslinker	10				140
B2: 2% copolymer, 10% crosslinker	10				280
B3: 5% copolymer, 5% crosslinker		10			350
B4: 5% copolymer, 10% crosslinker		10		70	
B5: 10% copolymer, 5% crosslinker			10	70	
B6: 10% copolymer, 10% crosslinker			10	140	

10

**Reaction with the fluorescein cadaverine:**

To verify the presence of reactive azlactone functionality, coated slides were evaluated by reaction with fluorescein cadaverine. A water-soaked piece of filter paper was placed in the bottom of each of 13 petri dishes. Each coated slide was placed in a 15 separate petri dish on top of the wet filter paper with the coated side up. Onto each slide were placed two spots each of 2 μl, 5 μl, and 7 μl of the fluorescein cadaverine solution, being careful to keep the spots separated. Each of the petri plates were then covered and allowed to stand overnight at ambient temperature. Each slide was washed well with deionized water, followed by a solution of 5% SDS, deionized water, and finally with 20 AMPSO buffer at pH 9.5. After washing, all slides were examined under the microscope, noting intensity of the fluorescence and quality of the adhesion to the substrate. All formulations exhibited good binding of the fluorescent amine, however B1, B3, and B5

WO 02/094890

PCT/US02/05433

did not display as good adhesion as the other formulations. The blank showed no fluorescence.

**EXAMPLE 10.**

5 Example 9 was repeated using the 70:30 w/w poly(DMA/VDM) copolymer of Example 1. In this case, all formulations exhibited excellent adhesion and dye binding, while the blank again showed no fluorescence.

**EXAMPLE 11.**

10 Example 10 was repeated using polycarbonate film as the substrate instead of glass slides. Results were similar to those observed in Example 10.

**EXAMPLE 12.****Coating of Particulate Substrates**

15 A 70:30 w/w copolymer of DMA and VDM similar to Polymer B of Example 5 (0.9 g of a 22.3% solids solution in isopropanol/toluene) was diluted to 25.5 ml with IPA to give a 1% solids solution. Ethylenediamine (4.8  $\mu$ l) was added to provide 10% crosslinking. The resulting solution was mixed in a round bottomed flask with 5.0 g POROS 50-R2 (porous, crosslinked styrene-divinylbenzene chromatographic beads from 20 PerSeptive Biosystems, Inc., Framingham, MA). The mixture was placed on a rotary evaporator and concentrated to dryness under vacuum. Diffuse reflectance infrared analysis of the coated particles showed absorbances at about 1650 and 1820  $\text{cm}^{-1}$ , indicative of the amide and azlactone carbonyl stretches of the copolymer, respectively.

25 A protein coupling solution consisting of 5 mg/ml myoglobin in 0.1 M CHES, pH 9.0, containing 1.0 M citrate and 0.1% by weight TWEEN 20 detergent was prepared. 30 mg of coated beads were mixed with 5 ml of protein solution. In a separate reaction, 30 mg of coated beads were pre-wet with 0.1 ml of methanol prior to the addition of protein solution. Beads were allowed to react with the protein coupling solution with end-over-end mixing for 1 hour. 1% SDS solution (3 ml) was added to each reaction and mixing 30 was continued for an additional 30 minutes. The mixtures were centrifuged and the absorbance of the supernates was measured at 532 nm and compared to a standard prepared by mixing 5 ml of protein solution with 3 ml SDS solution. From the supernate

WO 02/094890

PCT/US02/05433

absorbances, the beads in the first experiment were calculated to have coupled 27.9 mg myoglobin per gram of bead, whereas beads in the presence of methanol coupled 38.0 mg myoglobin per gram of bead. A control, uncoated bead exhibited no coupling of myoglobin.

5 In analogous experiments, porous and nonporous silica beads were coated with azlactone functional copolymers using either ethylenediamine or APTMS as crosslinkers.

#### EXAMPLE 13.

##### Coating of Nonwoven Webs

10 A variety of nonwoven webs were coated with hydrogels derived from a 70:30 w/w poly(DMA/VDM) prepared by free radical polymerization in IPA and crosslinked at the 10 wt.% level with either ethylenediamine (ED) or N-ethylethylenediamine (N-EED). The copolymer was diluted to either 1.5% or 3.0% solids with IPA prior to formulation with the crosslinker. Nonwovens used were commercial samples of spunbond nylon  
 15 (Nylon), polybutyleneterephthalate (PBT), polyethyleneterephthalate (PET), or polypropylene (PP). Samples of the nonwoven were soaked in coating solution for 30 minutes, patted dry with a wipe (Texwipe Co., Upper Saddle River, NJ), and dried in an oven at 50°C for 30 minutes. Following coating, the amount of available azlactone functional groups was determined by converting the azlactones to primary amines, then  
 20 measuring the amine content using a commercial ninhydrin assay kit (Applied Biosystems Corp., Foster City, California) according to the manufacturer's instructions. For this assay, a weighed sample of the coated nonwoven was allowed to react with a 0.5 M solution of ED in IPA for 30 minutes, then washed successively with 3-15 ml portions each of dimethylformamide, deionized water, and ethanol prior to beginning the ninhydrin assay. Results are listed in Table 3.

Table 3. Functionality of Coated Nonwovens

Example	Nonwoven	Web density (g/m <sup>2</sup> )	% Solids	Crosslinker	Amine Content (nmol/mg)
13a	Nylon	NA	3.0	ED	21
13b	PBT	41.2	3.0	ED	93
13c	PET	35.0	3.0	ED	104
13d	PP	15.0	1.5	ED	69

WO 02/094890

PCT/US02/05433

Example	Nonwoven	Web density (g/m <sup>2</sup> )	% Solids	Crosslinker	Amine Content (nmol/mg)
13e	PP	15.0	3.0	ED	148
13f	PP	15.0	1.5	N-EED	47
13g	PP	15.0	3.0	N-EED	93

**EXAMPLE 14.****Coating of Oriented Polymer Films**

Coating of the compositions of the present invention on biaxially oriented polyethylene film for the purposes of preparing miniaturized arrays is reported in International Publication Number WO 99/53319.

A substrate film was corona treated according to known techniques prior to coating. The substrate was coated by extrusion die coating with 70:30 w/w poly(DMA/VDM, with 10% 1,2-ethylenediamine (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin) by weight as crosslinker, prepared and diluted with isopropanol. Another substrate was treated and coated similarly, except that the coating was prepared and diluted in methyl ethyl ketone. Each substrate was tested for stability as follows.

A 50 mM sodium phosphate buffer was prepared at pH 8.38 with 1% (w/w) sodium dodecyl sulfate (SDS) in deionized water. The substrates were immersed in the buffer solution at 80°C for 5 hours. The substrates were analyzed using attenuated total reflectance (ATR) IR spectroscopy to detect presence of the coating.

The coating prepared in isopropanol provided better adhesion than the coating prepared in methyl ethyl ketone. Even better stability, even prior to relaxation of the substrate, is obtained by applying IPA-based coatings to metal coated oriented films such as those described in International Publication Number WO 01/16370.

Various modifications and alterations to this invention will become apparent to those skilled in the art without departing from the scope and spirit of this invention. It should be understood that this invention is not intended to be unduly limited by the illustrative embodiments and examples set forth herein and that such examples and embodiments are presented by way of example only with the scope of the invention intended to be limited only by the claims set forth herein as follows.

WO 02/094890

PCT/US02/05433

What is claimed is:

1. A crosslinked hydrogel for coating a substrate comprising:  
at least one azlactone-functional copolymer comprising a plurality of azlactone  
5 moieties, a plurality of azlactone functional groups, and at least one comonomer; and  
at least one crosslinker comprising a first moiety and a second moiety;  
wherein the first moiety of a first crosslinker is covalently bound to a first  
azlactone moiety and the second moiety of the first crosslinker is covalently bound to a  
second azlactone moiety or a second crosslinker.  
10
2. The crosslinked hydrogel of claim 1 wherein the second moiety of the first  
crosslinker is covalently bound to a second azlactone moiety.
3. The crosslinked hydrogel of claim 2 wherein at least one crosslinker comprises a  
15 primary polyamine.
4. The crosslinked hydrogel of claim 3 wherein the primary polyamine is  
ethylenediamine; 1,3-propanediamine; 1,3-diamino-2-hydroxypropane; 1,6-  
hexanediamine; or tris-(2-aminoethyl)amine.  
20
5. The crosslinked hydrogel of claim 2 wherein at least one crosslinker comprises a  
polyetherpolyamine.
6. The crosslinked hydrogel of claim 5 wherein the polyetherpolyamine is 4,7,10-  
25 trioxa-1,13-tridecanediamine; 3,6-dioxa-1,8-diaminoctane; an amine-terminated  
polyethyleneglycol homopolymer; an amine-terminated polyethyleneglycol copolymer; an  
amine-terminated polypropyleneglycol homopolymer; or an amine-terminated  
polypropylene copolymer.
7. The crosslinked hydrogel of claim 2 wherein at least one crosslinker comprises a  
30 1°/2° amine-containing compound.

WO 02/094890

PCT/US02/05433

8. The crosslinked hydrogel of claim 7 wherein the 1°/2° amine-containing compound is N-methyl-1,2-ethanediamine; N-ethyl-1,2-ethanediamine; or N-isopropyl-1,2-ethanediamine.
- 5 9. The crosslinked hydrogel of claim 1 wherein the second moiety of the first crosslinker is covalently bound to a second crosslinker.
- 10 10. The crosslinked hydrogel of claim 9 wherein the first crosslinker and the second crosslinker have the same chemical structure.
- 11 11. The crosslinked hydrogel of claim 9 wherein the first crosslinker and the second crosslinker have different chemical structures.
- 12 12. The crosslinked hydrogel of claim 9 wherein at least one crosslinker comprises a heterobifunctional crosslinker.
- 13 13. The crosslinked hydrogel of claim 12 wherein the heterobifunctional crosslinker is an aminoalkylmonoalkoxysilane, an aminoalkyldialkoxysilane, or an aminoalkyltrialkoxysilane.
- 14 14. The crosslinked hydrogel of claim 13 wherein the heterobifunctional crosslinker is 3-aminopropyltrimethoxysilane, 3-aminopropyltriethoxysilane, or N-[3-(trimethoxysilyl)propyl]ethylenediamine.
- 15 15. The crosslinked hydrogel of claim 1 wherein at least one comonomer is an acrylamide, a methacrylamide, an N-monosubstituted acrylamide, an N,N-disubstituted acrylamide, an N-monosubstituted methacrylamide, an N,N-disubstituted methacrylamide, an N-vinylamide or a hydroxyalkylacrylate.
- 16 16. The crosslinked hydrogel of claim 1 wherein at least one comonomer is an ionic comonomer.

WO 02/094890

PCT/US02/05433

17. The crosslinked hydrogel of claim 16 wherein the ionic comonomer is acrylic acid, methacrylic acid, maleic acid, fumaric acid, itaconic acid, vinyl phosphoric acid, vinyl phosphonic acid, styrenesulfonic acid, 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid, 2-vinylpyridine, 3-vinylpyridine, 4-vinylpyridine, (3-acrylamidopropyl)trimethylammonium chloride, 2-diethylaminoethylacrylate, 2-diethylaminoethylmethacrylate, 3-dimethylaminopropylacrylate, or 3-dimethylaminopropylmethacrylate.
18. The crosslinked hydrogel of claim 1 wherein at least one comonomer is non-hydrophilic.
19. The crosslinked hydrogel of claim 18 wherein the non-hydrophilic comonomer comprises a free radically polymerizable monomer.
20. The crosslinked hydrogel of claim 19 wherein the free radically polymerizable monomer is an acrylate ester, a methacrylate ester, or a styrene.
21. The crosslinked hydrogel of claim 18 wherein the copolymer comprises less than about 50% non-hydrophilic monomer, by weight.
22. The crosslinked hydrogel of claim 21 wherein the copolymer comprises less than about 30% non-hydrophilic monomer, by weight.
23. An article comprising:  
a substrate; and  
a hydrogel coating disposed upon the substrate, the coating comprising  
i) at least one azlactone-functional copolymer comprising a plurality of azlactone moieties and a plurality of azlactone functional groups, and  
ii) at least one crosslinker comprising a first moiety and a second moiety;  
wherein the first moiety of a first crosslinker is covalently bound to a first  
azlactone moiety and the second moiety of the first crosslinker is covalently bound to one  
of: a second azlactone moiety or a second crosslinker.

WO 02/094890

PCT/US02/05433

24. The article of claim 23 wherein the substrate comprises a plate, a film, a particle, a fiber, a column, a bead, a web, or a membrane.

25. The article of claim 23 further comprising a primer.

5

26. The article of claim 25 wherein the primer is polyethylenimine, polyvinylidene chloride, a colloidal dispersion of metal oxides, or an ambifunctional silane.

27. A composite comprising:

10

a substrate;  
a hydrogel coating disposed upon the substrate, the coating comprising  
i) at least one azlactone-functional copolymer comprising a plurality of azlactone moieties and a plurality of azlactone functional groups, and  
ii) at least one crosslinker comprising a first moiety and a second moiety,  
wherein the first moiety of a first crosslinker is covalently bound to a first azlactone moiety and the second moiety of the first crosslinker is covalently bound to a second azlactone moiety or a second crosslinker; and  
a functional material.

15

28. The composite of claim 27 wherein the substrate comprises a plate, a film, a particle, a fiber, a column, a bead, a web, or a membrane.

29. The composite of claim 27 further comprising a primer.

25

30. The composite of claim 29 wherein the primer is polyethylenimine, polyvinylidene chloride, a colloidal dispersion of metal oxides, or an ambifunctional silane.

30

31. The composite of claim 27 wherein the functional material is a polypeptide, a polynucleotide, a polysaccharide, or any combination thereof.

32. A method of making a crosslinked hydrogel coating comprising:

WO 02/094890

PCT/US02/05433

- preparing at least one azlactone-functional copolymer comprising a plurality of azlactone functional groups;
- 5       diluting the azlactone-functional copolymer in an organic solvent;
- adding at least one crosslinker comprising a first functional group and a second functional group to the azlactone-functional copolymer; and
- polymerizing the hydrogel by allowing the first functional group of a first crosslinker to covalently bind to a first azlactone functional group, and allowing the second functional group of the first crosslinker to covalently bind to a second azlactone functional group or a second crosslinker, to form a hydrogel.
- 10      33. A method of controlling gelation time of a hydrogel comprising:
- providing a solution of azlactone-functional copolymer comprising a plurality of azlactone functional groups;
- selecting at least one crosslinker comprising a first functional group and a second functional group;
- 15       adding the selected at least one crosslinker to the solution;
- providing reaction conditions that allow the first functional group of a first crosslinker to covalent bind with a first azlactone functional group; and
- changing the reaction conditions to allow the second functional group of a first crosslinker to covalently bind to a second azlactone functional group or a second crosslinker, to form a hydrogel.
- 20      34. The method of claim 33 wherein the second functional group of the first crosslinker covalently binds to a second azlactone functional group.
- 25      35. The method of claim 34 wherein at least one crosslinker comprises a 1°/2° amine-containing compound.
- 30      36. The method of claim 35 wherein the 1°/2° amine-containing compound is N-methyl-1,2-ethanediamine; N-ethyl-1,2-ethanediamine; or N-isopropyl-1,2-ethanediamine.

WO 02/094890

PCT/US02/05433

37. The method of claim 33 wherein the second functional group of the first crosslinker covalently binds to a second crosslinker.

5 38. The method of claim 37 wherein the first crosslinker and the second crosslinker have the same chemical structure.

39. The method of claim 37 wherein the first crosslinker and the second crosslinker have different chemical structures.

10 40. The method of claim 37 wherein at least one crosslinker comprises a heterobifunctional crosslinker.

15 41. The method of claim 40 wherein the heterobifunctional crosslinker is an aminoalkylmonoalkoxysilane, an aminoalkyldialkoxysilane, or an aminoalkyltrialkoxysilane.

42. The method of claim 41 wherein the heterobifunctional crosslinker is 3-aminopropyltrimethoxysilane, 3-aminopropyltriethoxysilane, or N-[3-(trimethoxysilyl)propyl]ethylenediamine.

20

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/US 02/05433						
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C08F8/32 C08F220/56 C08F226/06 C09D133/26 C08J7/12 C08J3/24 C12N11/08 C08K5/17 C08K5/5455 C08L33/26								
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC								
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C08F C08G C08K C09D C12N C08L C03C C08J G01N B01J								
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched								
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) WPI Data, EPO-Internal, PAJ, CHEM ABS Data								
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding-right: 10px;">Category *</th> <th style="text-align: left; padding-right: 10px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding-right: 10px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding-left: 10px;">X</td> <td style="padding-left: 10px;">US 3 583 950 A (HUBNER KLAUS ET AL) 8 June 1971 (1971-06-08) cited in the application claims; examples 1-16 column 2, line 4 - line 50 column 4, line 13 -column 5, line 62 ----- DE 19 36 155 A (ROEHM &amp; HAAS GMBH) 25 February 1971 (1971-02-25)  claims; examples page 3, paragraph 2 -page 5, paragraph 1 page 6, paragraph 3 -page 7, paragraph 2 -----</td> <td style="padding-left: 10px;">1-4, 15-24, 32  1,2,5,6, 15, 18-20, 23-25, 32  -----</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	US 3 583 950 A (HUBNER KLAUS ET AL) 8 June 1971 (1971-06-08) cited in the application claims; examples 1-16 column 2, line 4 - line 50 column 4, line 13 -column 5, line 62 ----- DE 19 36 155 A (ROEHM & HAAS GMBH) 25 February 1971 (1971-02-25)  claims; examples page 3, paragraph 2 -page 5, paragraph 1 page 6, paragraph 3 -page 7, paragraph 2 -----	1-4, 15-24, 32  1,2,5,6, 15, 18-20, 23-25, 32  -----
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.						
X	US 3 583 950 A (HUBNER KLAUS ET AL) 8 June 1971 (1971-06-08) cited in the application claims; examples 1-16 column 2, line 4 - line 50 column 4, line 13 -column 5, line 62 ----- DE 19 36 155 A (ROEHM & HAAS GMBH) 25 February 1971 (1971-02-25)  claims; examples page 3, paragraph 2 -page 5, paragraph 1 page 6, paragraph 3 -page 7, paragraph 2 -----	1-4, 15-24, 32  1,2,5,6, 15, 18-20, 23-25, 32  -----						
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.						
<small>* Special categories of cited documents :</small> *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *B* earlier document but published on or after the international filing date *I* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed								
<small>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention            *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone            *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.            *&amp;* document member of the same patent family</small>								
Date of the actual compilation of the international search	Date of mailing of the international search report							
17 October 2002	24/10/2002							
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5916 Patentkant 2 NL-2280 RZ, The Hague, The Netherlands Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Hollender, C							

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/US 02/05433
C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 53319 A (3M INNOVATIVE PROPERTIES CO) 21 October 1999 (1999-10-21) cited in the application page 12, line 18 - line 26 page 12, line 33 -page 13, line 25 page 14, line 16 - line 22 examples 10-13,17; table 1 ----	1-4,15, 23-32
X	WO 88 07062 A (MINNESOTA MINING & MFG) 22 September 1988 (1988-09-22) page 14, line 35 - line 15; example 2 ----	1-4,15
A	WO 00 26725 A (MINNESOTA MINING & MFG) 11 May 2000 (2000-05-11) claims 1,2,4-6,14-16 page 4, line 22 -page 5, line 18 page 6, line 19 -page 7, line 14 examples 1,4 ----	1,9,12, 33
A	WO 98 28026 A (CHABRECEK PETER ;CIBA GEIGY AG (CH); LOHMANN DIETER (CH)) 2 July 1998 (1998-07-02) page 1, paragraph 1 page 17, paragraph 2 - paragraph 3 examples B-7,B-8,C16-C18 ----	1,2,5,6, 23,24,32

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/US 02/05433

Patent document cited in search report	Publication date		Patent family member(s)	Publication date
US 3583950	A 08-06-1971		DE 1745348 A1 BE 724699 A FR 1596614 A GB 1202119 A NL 6817142 A US 3598790 A	09-09-1971 02-05-1969 22-06-1970 12-08-1970 03-06-1969 10-08-1971
DE 1936155	A 25-02-1971		DE 1936155 A1	25-02-1971
WO 9953319	A 21-10-1999		US 6376619 B1 AU 3744199 A EP 1073904 A2 JP 2002511586 T US 2002143110 A1 US 2002143111 A1 US 2002122917 A1 WO 9953319 A2	23-04-2002 01-11-1999 07-02-2001 16-04-2002 03-10-2002 03-10-2002 05-09-2002 21-10-1999
WO 8807062	A 22-09-1988		US 4737560 A US 4871824 A DE 3867471 D1 DK 632488 A EP 0364909 A1 JP 2502465 T JP 2827182 B2 WO 8807062 A1 US 5403902 A US 5292840 A US 5336742 A	12-04-1988 03-10-1989 13-02-1992 11-11-1988 21-02-1990 09-08-1990 18-11-1998 22-09-1988 04-04-1995 08-03-1994 09-08-1994
WO 0026725	A 11-05-2000		US 6156478 A AU 749808 B2 AU 2902199 A CN 1325505 T EP 1127293 A1 JP 2002529543 T WO 0026725 A1 US 6372407 B1	05-12-2000 04-07-2002 22-05-2000 05-12-2001 29-08-2001 10-09-2002 11-05-2000 16-04-2002
WO 9828026	A 02-07-1998		AU 732216 B2 AU 5984998 A BR 9714429 A CN 1245439 A WO 9828026 A1 EP 0946220 A1 JP 2001507255 T NO 993064 A NZ 336158 A US 6436481 B1 ZA 9711491 A	12-04-2001 17-07-1998 25-04-2000 23-02-2000 02-07-1998 06-10-1999 05-06-2001 21-06-1999 22-12-2000 20-08-2002 23-06-1998

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

---

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P,L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(72)発明者 ハダッド, ルイス シー.

アメリカ合衆国, ミネソタ 55133-3427, セント ポール, ポスト オフィス ボック  
ス 33427

(72)発明者 ヘンブル, ジェイムズ アイ.

アメリカ合衆国, ミネソタ 55133-3427, セント ポール, ポスト オフィス ボック  
ス 33427

(72)発明者 ラスムッセン, ジェラルド ケー.

アメリカ合衆国, ミネソタ 55133-3427, セント ポール, ポスト オフィス ボック  
ス 33427

(72)発明者 サーポング, ダニエル

アメリカ合衆国, ミネソタ 55133-3427, セント ポール, ポスト オフィス ボック  
ス 33427

F ターム(参考) 4J100 AB07Q AJ02Q AJ09Q AL09Q AM15Q AM17Q AN04Q AP07Q AQ08Q AQ12Q

AU35P BA13Q BA64Q BA65Q BC79P CA04 JA01